

Estudio experimental del efecto de la terapia con Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la reparación de lesiones musculares o tendinosas en la especie ovina

Nombre del doctorando: Daniel Aguilar García

TITULO: *Estudio experimental del efecto de la terapia con Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la reparación de lesiones musculares o tendinosas en la especie ovina*

AUTOR: *Daniel Aguilar García*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DE LA TERAPIA CON PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA REPARACIÓN DE LESIONES MUSCULARES O TENDINOSAS EN LA ESPECIE OVINA

DOCTORANDO/A: Daniel Aguilar García

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Durante el período de realización de esta tesis doctoral, llevada a cabo bajo nuestra dirección, el doctorando ha mostrado una plena dedicación e interés en las tareas de investigación que se le han asignado. El doctorando ha sido capaz de realizar una labor de investigación con rigor científico. Este trabajo de investigación ha sido plasmado en la presente tesis doctoral, que reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada y defendida ante un tribunal. Durante el período de desarrollo de la tesis doctoral, la actitud del doctorando nos ha resultado gratamente positiva y hemos percibido una destacada progresión en cuanto a su capacidad investigadora.

Esta tesis doctoral ha seguido un plan de trabajo estructurado y distribuido a lo largo de cuatro años:

- Primer año: estudio y recopilación del material bibliográfico relacionado con la temática de la tesis. Comienzo de la escritura de la sección “Revisión bibliográfica”.
- Segundo año: realización de la fase experimental y toma de datos del primer estudio sobre un modelo animal de rotura aguda del tendón de Aquiles en la oveja. Diseño y puesta a punto del modelo experimental *in vivo* de rotura muscular de grado II en el bíceps femoral en la oveja, que se desarrollará para el segundo estudio. Continuación con la recolección de los registros bibliográficos, y finalización de la sección “Revisión bibliográfica”.
- Tercer año: realización de la fase experimental y toma de datos del segundo estudio. Escritura de la parte “Material y Método” de ambos estudios

experimentales. Análisis estadístico de los datos obtenidos y redacción del apartado “Resultados”.

- Cuarto año: análisis de los resultados obtenidos y su comparación con los estudios previos registrados en el apartado “Revisión bibliográfica”. Redacción de la “Discusión” de la tesis doctoral. Divulgación científica del trabajo realizado a lo largo del desarrollo de la tesis.

El presente trabajo de tesis doctoral ha generado hasta el momento la siguiente producción científica:

1- Comunicaciones científicas en congresos internacionales

AUTOR/ES: **Aguilar-García D**, Granados MM, Fernández-Sarmiento JA, Morgaz J, Navarrete R, Muñoz P, Ruiz P, Gómez-Villamandos R, Domínguez JM

TÍTULO: Evaluación del efecto del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) sobre un estadio temprano de cicatrización tendinosa en un modelo experimental de rotura de tendón calcáneo común en ovejas

ENTIDAD ORGANIZADORA: Facultad de Veterinaria, Universidad de León

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

TÍTULO DEL CONGRESO: XX Congreso internacional Sociedad Española de Cirugía Veterinaria

ÁMBITO (Nacional/internacional): Internacional

DATOS DE LA PUBLICACIÓN:

- Volumen: 1
- Editorial: Área de publicaciones de la Universidad de León
- Páginas (inicial y final): 70-73
- País de Publicación: España
- Año de publicación: 2015
- ISSN/ISBN (si lo tiene)/Depósito Legal: 978-84-9773-734-0 / LE-289-2015

LUGAR DE CELEBRACIÓN: León (España)

FECHA: 19 y 20 de Junio de 2015

AUTOR/ES: **Daniel Aguilar García**, José Andrés Fernández Sarmiento, Pilar Muñoz Rascón, M^a del Mar Granados Machuca, Yolanda Millán, Juan Morgaz Rodríguez, Rocío Navarrete Calvo, Rafael J Gómez Villamandos, José M^a Carrillo, Ramón Cugat, Juan Manuel Domínguez Pérez

TÍTULO: Empleo de Plasma Rico en Factores de Crecimiento en lesiones musculares de grado II

ENTIDAD ORGANIZADORA: Sociedad Española de Cirugía Veterinaria

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

TÍTULO DEL CONGRESO: XXII Congreso internacional de la Sociedad Española de Cirugía Veterinaria

ÁMBITO (Nacional/internacional): Internacional

DATOS DE LA PUBLICACIÓN:

- Volumen: 1
- Editorial: Diego Marín Librero – Editor
- Páginas (inicial y final): 227-232
- País de Publicación: España
- Año de publicación: 2017
- ISSN/ISBN: 978-84-17010-17-1

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Murcia (España)

FECHA: del 17 al 19 de Febrero de 2017

2- Comunicaciones científicas en congresos nacionales

AUTOR/ES: **Aguilar-García D**

TÍTULO: Evaluación histopatológica de la fase inicial del proceso de cicatrización tendinosa tras la aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en un modelo experimental de rotura de tendón calcáneo común en ovejas

ENTIDAD ORGANIZADORA: Universidad de Córdoba

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

TÍTULO DEL CONGRESO: III Congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba (España)

FECHA: 9 y 10 de Abril de 2013

AUTOR/ES: **Aguilar-García D**

TÍTULO: Efecto anti-inflamatorio del plasma rico en factores de crecimiento sobre el proceso de cicatrización tendinosa en un modelo experimental de rotura aguda de tendón calcáneo común en oveja

ENTIDAD ORGANIZADORA: Universidad de Córdoba

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación póster

TÍTULO DEL CONGRESO: IV Congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba (España)

FECHA: 18 y 19 de Noviembre de 2014

3- Ponencias por invitación en jornadas de carácter internacional

AUTOR: **Daniel Aguilar García**

TÍTULO: PRGF en lesiones musculares de grado II

ENTIDAD ORGANIZADORA: Cátedra Fundación García Cugat – CEU-UCH de Medicina y Cirugía Regenerativa

TÍTULO DE LAS JORNADAS: VII Jornadas Internacionales Fundación García Cugat

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia (España)

FECHA: 28 y 29 de Octubre de 2016

4- Aportaciones científicas en revistas indexadas

TÍTULO: Effect of Plasma Rich in Growth Factor son the Early Phase of Healing of Surgically Severed Achilles Tendon in Sheep: Histological Study

AUTORES (p.o. de firma): **Aguilar-García D**, Fernández-Sarmiento JA, Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Vilar JM, Cugat R, Domínguez JM

REVISTA (año, vol., pág.): Journal of Applied Animal Research (2017); *in press*

FACTOR DE IMPACTO: 0.503

Además de trabajar en el desarrollo del trabajo de la tesis doctoral, el doctorando ha participado de forma activa y entusiasta en todos los proyectos de investigación llevados a cabo en la unidad de “Anestesia y Cirugía Animal” del “Departamento de Medicina y Cirugía Animal”, figurando en la lista de autores de diversas comunicaciones y artículos científicos, e integrándose con facilidad dentro de nuestro grupo de trabajo.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 30 de Mayo de 2017

Firma del/de los director/es



Fdo.: Juan Manuel Domínguez Pérez



Fdo.: José Andrés Fernández Sarmiento

Índice

I. INTRODUCCIÓN	15
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
2.1- Anatomía funcional del tendón de Aquiles	21
2.1.1- Riego sanguíneo e innervación	22
2.2- Estructura y composición del tendón de Aquiles.....	22
2.3- Histología del tendón de Aquiles	24
2.4- Anatomía funcional del músculo bíceps femoral.....	27
2.4.1- Riego sanguíneo e innervación	28
2.5- Estructura y composición del músculo esquelético	28
2.6- Histología del músculo esquelético.....	31
2.7- Rotura aguda del tendón de Aquiles.....	34
2.7.1- Cicatrización tendinosa	34
2.8- Rotura muscular aguda	38
2.8.1- Cicatrización muscular.....	39
2.8.2- Regeneración de las fibras musculares.....	41
2.8.3- Formación de tejido conectivo cicatricial	43
2.8.4- Vascularización del músculo dañado	44
2.8.5- Regeneración de los nervios intramusculares	45
2.9- Las plaquetas: origen, estructura y función en la cicatrización tisular.....	46
2.9.1- Origen de las plaquetas	46
2.9.2- Estructura plaquetaria.....	47
2.9.3- Función plaquetaria en la cicatrización tisular.....	51
2.10- Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF).....	56
2.11- Empleo de PRP en rotura aguda de tendón	59
2.11.1- Estudios experimentales del uso de PRP en una rotura aguda de tendón	59
2.11.2- Estudios clínicos del uso de PRP en una rotura aguda de tendón	72
2.12- Empleo de PRP en rotura muscular de grado II	77
2.12.1- Estudios experimentales del uso de PRP en una rotura muscular de grado II.....	77
2.12.2- Estudios clínicos del uso de PRP en lesiones musculares de grado II	83
III. OBJETIVOS.....	89

IV. MATERIAL Y MÉTODO ESTUDIO 1.....	93
4.1- Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología de estudio	95
4.2- Animales	95
4.3- Modelo experimental de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.....	96
4.4- Obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles reparado.....	100
4.5- Estudio histopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles.....	103
4.5.1- Eutanasia de los animales.....	103
4.5.2- Obtención y procesado de los tendones	103
4.5.3- Estudio histológico.....	104
4.6- Análisis estadístico.....	111
V. RESULTADOS ESTUDIO 1.....	113
5.1- Modelo experimental de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina.....	115
5.2- Estudio histopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles.....	116
5.2.1- Morfometría del núcleo de los fibroblastos.....	116
5.2.2- Densidad de fibroblastos	117
5.2.3- Respuesta vascular	117
5.2.4- Grado de inflamación	118
5.2.5- Organización de las fibras de colágeno.....	120
5.2.6- Evaluación IHQ del colágeno tipo I y colágeno tipo III	121
VI. DISCUSIÓN ESTUDIO 1	123
6.1- Empleo de PRGF en una rotura aguda de tendón	125
6.2- Evaluación histopatológica del efecto del PRGF sobre un estadio temprano del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles	126
6.3- Comparación de nuestros resultados experimentales con los estudios clínicos que emplean PRP en el tratamiento de una rotura aguda de tendón.....	131
6.4- Limitaciones del estudio.....	132

VII. MATERIAL Y MÉTODO ESTUDIO 2.....	133
7.1- Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología de estudio	135
7.2- Animales	136
7.3- Modelo experimental de rotura muscular de grado II del bíceps femoral en la especie ovina.....	137
7.4- Obtención y aplicación de PRGF en la rotura muscular de grado II en el bíceps femoral	144
7.5- Estudio histopatológico y bioquímico del proceso de cicatrización de una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral	146
7.5.1- Eutanasia de los animales.....	146
7.5.2- Obtención y procesado de los músculos	147
7.5.3- Estudio histológico.....	150
7.5.4- Estudio bioquímico	152
7.6- Análisis estadístico.....	155
VIII. RESULTADOS ESTUDIO 2	157
8.1- Modelo experimental de rotura muscular de grado II del bíceps femoral en la especie ovina.....	159
8.2- Estudio histológico.....	160
8.2.1- Estudio histoquímico.....	160
8.2.2- Estudio con microscopía electrónica de transmisión	168
8.3- Estudio bioquímico	169
IX. DISCUSIÓN ESTUDIO 2	175
9.1- Empleo de PRGF en una rotura muscular de grado II.....	177
9.2- Evaluación histopatológica y bioquímica del efecto del PRGF sobre la reparación muscular tras una rotura de grado II en el bíceps femoral	178
9.3- Comparación de nuestros resultados experimentales con los estudios clínicos que emplean PRP en el tratamiento de una rotura muscular de grado II	184
9.4- Limitaciones del estudio.....	186
X. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	189

XI. RESUMEN / SUMMARY	195
XII.AGRADECIMIENTOS	201
XIII. BIBLIOGRAFÍA	203

I. Introducción

La prolongación de la esperanza de vida en el mundo actual, unido al aumento en la práctica de diferentes disciplinas deportivas, hacen que se registre un incremento progresivo en la prevalencia de lesiones musculares y tendinosas a lo largo de los últimos años [8,72,82,220]. Este tipo de lesiones van a provocar una interrupción temporal o incluso permanente de la actividad física del individuo [72,82,220].

El tejido tendinoso en particular, se caracteriza por presentar un bajo potencial de cicatrización debido al reducido aporte vascular que recibe, y a su escasa densidad celular con un ritmo metabólico bajo [75,128]. Por otro lado, la rotura de fibras musculares, particularmente de la musculatura isquiotibial, no sólo se trata de una lesión con una incidencia de aparición sublime en el ámbito deportivo, sino que además el riesgo de presentar lesiones recidivantes es muy elevado [7,170]. Este riesgo añadido está asociado a la formación de una cicatriz de tejido fibroso patológico, que queda acumulado en el foco lesional antiguo tras la culminación completa del proceso de cicatrización [83]. Son estas las razones por la cual la comunidad científica está trabajando continuamente en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, para tratar de superar de forma exitosa las dificultades que se presentan en el tratamiento de las patologías musculares y tendinosas [8].

Está ampliamente demostrado el importante papel que desempeñan las plaquetas sobre la modulación de los fenómenos inflamatorios, la respuesta inmunitaria, la respuesta vascular, y en la multitud de procesos de reparación y regeneración del tejido, cuando se produce un daño tisular [11,194,259]. Siguiendo este razonamiento, desde finales del siglo XX y principio del siglo XXI, se comenzaron a utilizar los factores de crecimiento alojados en el interior de las plaquetas, y el Plasma Rico en Plaquetas (PRP), con la finalidad de acelerar y mejorar los procesos de reparación tisular [10,14,185].

Existen diversos estudios que demuestran que el uso de PRP como terapia adyuvante para el tratamiento de una rotura aguda de tendón, provoca una modulación de la respuesta inflamatoria, un aumento en la densidad de fibroblastos, un incremento de la producción de colágeno de la matriz extracelular (MEC), y un mayor estímulo de remodelación del tejido neoformado tras producirse la rotura [14,76,163,224]. En consecuencia, se produce una aceleración en el proceso de cicatrización tendinosa, y una mayor calidad en el tejido regenerado, que resulta ser similar al tejido tendinoso

previo a la lesión. En esta misma línea, se ha demostrado que el uso de PRP para el tratamiento de una lesión muscular de grado II, provoca un aumento en la regeneración de las fibras musculares rotas, y consecuentemente una aceleración en el proceso de reparación muscular [96,221,247]. Desde un punto de vista clínico, la importancia del empleo de PRP en el tratamiento de las lesiones músculo-tendinosas resulta crucial, ya que el paciente disminuye el período de convalecencia de forma significativa, y al presentarse una mejor calidad del tejido regenerado, previsiblemente, la incidencia de aparición de lesiones recidivantes se ve igualmente reducida [78,191,218,221].

Al contrario que los resultados prometedores asociados a esta terapia autóloga, existen otros estudios que demuestran una ausencia de efecto de la terapia con PRP, o incluso un efecto no deseado de dicho tratamiento sobre el tejido muscular y tendinoso en regeneración [94,131,210,223].

Tras la puesta en común de la totalidad de los estudios experimentales y clínicos sobre el uso de PRP para el tratamiento de lesiones musculares y tendinosas, se describe una gran variabilidad en los resultados obtenidos [8]. Hecho que puede estar determinado por las diferentes metodologías de obtención y aplicación de PRP, y en consecuencia, con diferencias considerables en su composición y en los efectos sobre la reparación muscular y tendinosa [15-16,215,262]. Ante esta situación, es necesario seguir investigando en el efecto de la terapia con PRP sobre el tejido tendinoso y muscular tras producirse una rotura tisular aguda, así como tratar de elucidar la composición ideal, dosis, volumen y pauta de administración para el abordaje del tratamiento de este tipo de lesiones [16-17].

II. Revisión bibliográfica

2.1- Anatomía funcional del tendón de Aquiles

El tendón de Aquiles es el tendón más grueso y fuerte del cuerpo humano. Topográficamente comienza a nivel de la mitad posterior de la pierna uniéndose al músculo gastrocnemio proximalmente. En su origen es ancho y plano, y ya a nivel distal recibe fibras del músculo sóleo en diferente proporción dependiendo del individuo. Su morfología cambia de forma progresiva hacia redondeada al desplazarse hacia su punto de inserción distal (**Figura 1**) [68].

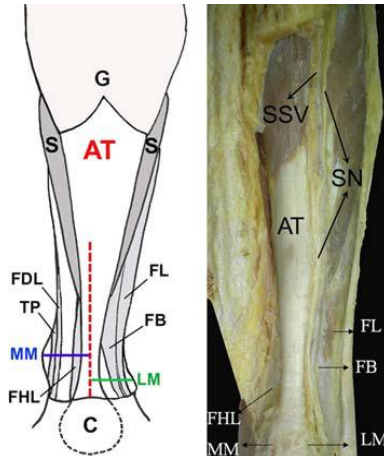


Figura 1: Esquema del Tendón de Aquiles (AT) (**izquierda**) y vista anatómica posterior (**derecha**); sus componentes musculares: Sóleo (S) y Gastrocnemio (G); y las diferentes estructuras anatómicas que lo limitan: Nervio sural (SN), Vena safena pequeña (SSV), Músculo flexor hallucis largo (FHL), Músculo tibial posterior (TP), Músculo flexor digital largo (FDL), Músculo peroneo largo (FL), Músculo peroneo corto (FB), Maléolo medial (MM), Maléolo lateral (LM).

Las fibras del tendón de Aquiles no se disponen estrictamente alineadas de forma vertical, de manera que se disponen en forma de espiral de hasta 90°, dando lugar a un área de estrés localizado [69]. Las fibras del tendón procedentes del músculo gastrocnemio se insertan en la zona posterolateral, mientras que aquellas procedentes del músculo sóleo alcanzan el tendón por su cara posteromedial. La extensión de su rotación en las fibras viene determinada por el punto de fusión entre los dos músculos, de manera que cuanto más distal se fusionen resultan en una rotación mayor. La torsión del tendón puede provocar una constricción de la red vascular. Sin embargo, cuando el tendón presenta las propiedades biomecánicas normales, su laxitud hace que no se produzca el colapso vascular de parte del tendón, al deformarse según la demanda de movimiento. De esta manera, se puede ver disminuida la deformación de las fibras de

colágeno, así como el deslizamiento entre unas y otras, resultando en una mayor capacidad para soportar fuerza en la totalidad del tendón de Aquiles [68].

2.1.1- Riego sanguíneo e inervación

El aporte sanguíneo al tendón de Aquiles es por lo general escaso, y procede de tres fuentes diferentes: la unión músculo-tendinosa, el tejido conectivo que lo rodea y la unión osteo-tendinosa [1]. La cantidad de riego sanguíneo que recibe el tendón está estrechamente relacionado con la edad del individuo, de forma que presenta una relación inversamente proporcional [167]. La principal fuente arterial procede de la rama recurrente de la arteria tibial posterior, la cual irriga principalmente a los tejidos peritendinosos. Además, la arteria peronea aporta riego aunque en menor medida. El tercio proximal recibe riego adicional a través de los vasos arteriales procedentes del vientre muscular, y se extienden hasta el endotenon. Por otra parte, el tercio distal del tendón recibe vascularización adicional, principalmente a través de pequeños vasos sanguíneos ramas directas de las arterias peronea y tibial posterior. Por último, el tercio medio se considera una porción tendinosa muy poco vascularizada, con presencia de algunos pequeños vasos arteriales perforantes, procedentes de la arteria peronea [68]. Debido a la escasa vascularización en el tercio medio, se explica la mayor incidencia de lesiones en comparación al resto de la extensión del tendón [55].

En cuanto a la inervación se refiere, el tendón de Aquiles recibe la inervación de la musculatura a la cual se une, y los nervios cutáneos del área donde se localiza, en particular del nervio sural, con un pequeño aporte del nervio tibial [196]. Las terminaciones nerviosas se unen para formar un plexo longitudinal que suplente a las fibras aferentes en su amplia mayoría. Los receptores de las fibras aferentes están fundamentalmente localizados a nivel de la unión osteo-tendinosa [196].

2.2- Estructura y composición del tendón de Aquiles

Macroscópicamente el tendón de Aquiles tiene un aspecto blanquecino y brillante, con textura fibroelástica. El tejido tendinoso está compuesto por tenoblastos y tenocitos inmersos en una amplia matriz extracelular (MEC). Ambos tenocitos y tenoblastos suponen el 90-95% de todos los elementos celulares del tendón [134]. El restante 5-10% de los componentes celulares está compuesto por condrocitos, ubicados en la unión ósea y punto de inserción, sinoviocitos, procedentes de la vaina tendinosa,

células vasculares, incluyendo las células del endotelio capilar y las células del músculo liso de las arteriolas [234].

Los tenocitos se encargan de la síntesis del colágeno y el resto de componentes de la MEC, así como juegan un papel importante en la generación de energía [195]. Con el paso de la edad, el metabolismo celular pasa de una producción de energía de forma aeróbica, a la producción anaeróbica [134]. El consumo de oxígeno en el tejido tendinoso es 7.5 veces inferior al tejido muscular [254]. El ritmo metabólico bajo, junto con la capacidad de los tenocitos de producir energía de forma anaeróbica, permite al tendón mantener cargas y tensión durante largos períodos de tiempo, así como evitar el riesgo de daño celular por isquemia y consecuente necrosis [236]. El inconveniente más importante de esta adaptación fisiológica, es que un ritmo metabólico bajo resulta en una cicatrización lenta cuando se produce un daño tendinoso [266].

La cantidad de agua del tejido supone sobre un 70% de la masa total del tendón. El colágeno tipo I supone el 65-80% del peso seco [195]. El colágeno se organiza de forma jerárquica según la complejidad de su estructura: comienza con la molécula de tropocolágeno, una cadena polipeptídica en forma de triple hélice; fibrillas, resultado de la unión de varias cadenas de tropocolágeno; fibras de colágeno; haces primarios; fascículos o haces secundarios; haces terciarios; tendón completo (**Figura 2**) [123,134].

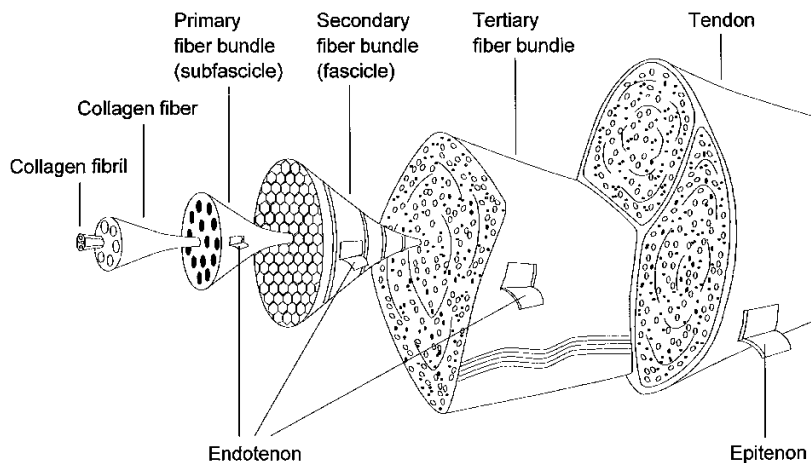


Figura 2: Esquema de la organización jerárquica del tendón normal, desde las moléculas de tropocolágeno hasta el tendón completo, con sus respectivas envolturas de la MEC.

La MEC alrededor de las fibras de colágeno y los tenocitos, está compuesta principalmente por proteoglicanos, glicosaminoglicanos y glicoproteínas [134]. La

fuerte naturaleza hidrofílica de los proteoglicanos permite la difusión rápida de moléculas solubles en agua y la migración celular. Las glicoproteínas adhesivas, como la fibronectina y la trombospondina, participan en los procesos de reparación y regeneración del tendón tras producirse un daño [122]. La tenascina-C es otro componente importante de la MEC, ya que presenta funciones de amortiguación de estrés en el tendón debido a sus propiedades moleculares elásticas. Además, la tenascina-C participa en el alineamiento y orientación de las fibras de colágeno [133].

El tendón de Aquiles está cubierto por el peritenon, constituido por una capa de tejido conectivo compuesta por fibras de colágeno tipo I y tipo III, fibras de elastina, y sinoviocitos en su interior. En profundidad al paratenon, el epitenon envuelve a todo el tendón, como una fina vaina de tejido conectivo que contiene el aporte vascular, linfático y nervioso del tendón. El epitenon se extiende en profundidad hacia el espesor del tendón, entre los haces terciarios para formar el endotenon. El endotenon envuelve de forma individual las fibras tendinosas (**Figura 2**) [134].

2.3- Histología del tendón de Aquiles

Los componentes celulares en el tendón normal son los mencionados en el apartado anterior. En condiciones patológicas, se pueden observar otros tipos celulares como diferentes células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas) y miofibroblastos [124,134]. El tendón de Aquiles normal en el individuo adulto presenta a nivel histológico una alta organización a lo largo del eje longitudinal del tendón [167]. Los tenocitos aparecen en baja densidad, alineados y empaquetados entre las fibras de colágeno a lo largo del eje de carga del tendón [203]. La morfología celular de los tenocitos es de aspecto aplanado y fusiforme, y funcionalmente se encargan de la síntesis de los componentes de la MEC y el procolágeno, dando lugar a bloques de proteínas altamente organizados [139]. En el individuo en desarrollo (tendón normal), y en la fase temprana de reparación en el tejido neoformado tras un daño en el individuo adulto, la relación componente celular/MEC es elevada. Cuando el tejido tendinoso comienza a madurar, la relación componente celular/MEC disminuye de forma progresiva [134]. Los tenoblastos presentan una longitud de 20-70 μm y una anchura de 8-20 μm . El núcleo varía en su morfología desde ovoide hacia alargada, correspondiéndose a un estado de menor a mayor madurez del tejido, respectivamente

(**Figura 3**) [134]. Esta morfología celular ovoide de los tenoblastos es indicativa de la presencia de una alta tasa de actividad metabólica [134]. Con el crecimiento del individuo joven, y/o la madurez del tejido neoformado en el adulto, los tenoblastos se transforman en tenocitos, con morfología muy alargada y dimensiones de 80-300 μm de diámetro. La relación núcleo-citoplasma aumenta, y los procesos celulares se convierten en más largos y delgados, dando una morfología estrellada en el corte transversal [123]. El núcleo es alargado y ocupa casi la totalidad de la longitud de la célula (**Figura 3**). Los procesos celulares largos son necesarios para aumentar el contacto entre las células y la MEC. Este fenómeno se produce para compensar la disminución en el número de células y el incremento de la MEC en el tejido tendinoso [123]. El cambio en esta morfología celular es debido a que el ritmo metabólico de los tenocitos maduros es bajo, debido a la adaptación fisiológica explicada anteriormente [254].

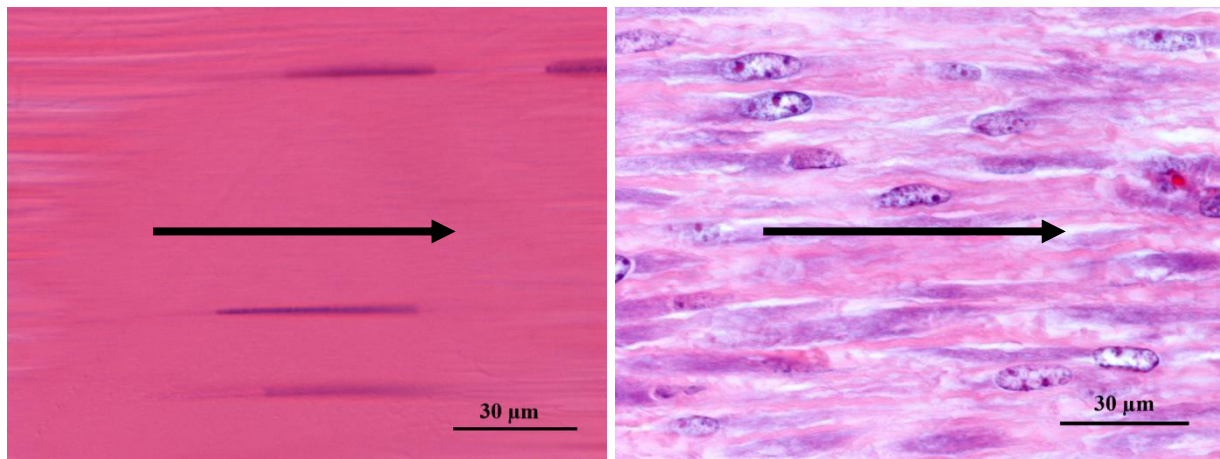


Figura 3. Imagen histológica representativa del tendón de Aquiles sano, con presencia de tenocitos en baja densidad celular, núcleo alargado y orientado paralelo al eje longitudinal del tendón (flecha) (**izquierda**). Imagen histológica representativa de un tendón de Aquiles en regeneración, con una mayor densidad celular, núcleos con morfología ovoide, y con una menor organización con respecto al eje longitudinal del tendón (flecha) (**derecha**).

El colágeno y la elastina constituyen los componentes principales de la MEC del tendón [196]. Las fibras de colágeno en el tendón intacto se muestran perfectamente empaquetadas y paralelas al eje largo del tendón, para formar fascículos en la organización jerárquica previamente descrita [203]. Además, en el espesor de las fibras colagénicas se alojan los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos propios del tejido [167]. Cuando el tendón se encuentra en reposo, las fibras de colágeno se distribuyen formando ondulaciones a lo largo del eje longitudinal [134]. Esta configuración

desaparece cuando se somete el tendón a una determinada carga, y en caso de no tratarse de una fuerza aplicada excesiva, las ondulaciones vuelven a aparecer cuando cesa la tensión [134].

2.4- Anatomía funcional del músculo bíceps femoral

Se trata de una estructura muscular compleja que se localiza en la cara posterolateral del muslo. Este se origina de dos puntos, diferenciando la cabeza muscular larga, desde la porción medial de la tuberosidad isquiática, y la cabeza corta, que emerge de la cresta supracondilar lateral del fémur y el tercio medio de la línea áspera (**Figura 4**) [144].

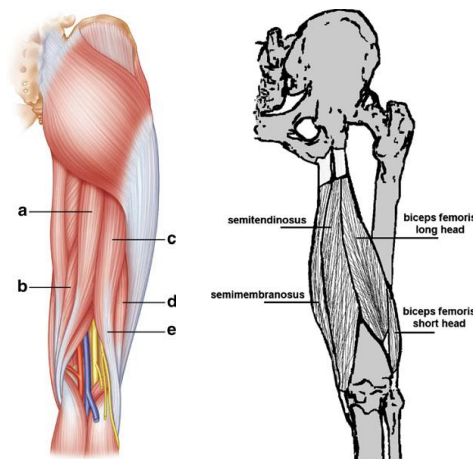


Figura 4: Ilustración anatómica de la musculatura isquiotibial (**izquierda**); Ilustración del origen e inserción ósea de la musculatura isquiotibial (**derecha**); **a:** Semitendinoso; **b:** Semimembranoso; **c y e:** cabeza larga del Bíceps femoral; **d:** cabeza corta del Bíceps femoral.

El origen de la cabeza corta del bíceps femoral se utiliza muy frecuentemente como referencia anatómica para clasificar el daño o rotura muscular como proximal o distal [62]. La inserción tendinosa de la cabeza larga del músculo bíceps femoral se comienza a formar proximal a la rodilla y luego se divide en dos componentes tendinosos, y tres componentes faciales en la rodilla [249]. Por otro lado, la cabeza corta del músculo bíceps femoral realiza su inserción en las caras anterior y medial del tendón distal de la cabeza larga. Se describen dos anclajes tendinosos a la cápsula articular posterolateral a nivel del cuerno posterior del menisco lateral (brazo capsular), de la cabeza del peroné (brazo directo), y lateral a la tuberosidad de la tibia, 1 cm posterior al tubérculo de Gerdy (brazo anterior). Además se describe otra inserción capsulo-ósea iliotibial de significancia clínica [249]. Esto explica que tras producirse un daño a lo largo del músculo, tenga lugar una pérdida en la estabilidad de la rodilla [108]. A nivel clínico, se ha descrito que cuando se produce un daño en las diversas porciones tendinosas de inserción del músculo bíceps femoral, se observa una inestabilidad rotacional anterolateral-anteromedial de dicha articulación [248]. Es por ello por lo que

el músculo bíceps femoral se considera una estructura compleja, con una función estabilizadora dinámica de la articulación de la rodilla [144].

2.4.1- Riego sanguíneo e inervación

El aporte sanguíneo de ambas porciones musculares corre a cargo de la arteria femoral profunda, afluente directo de la arteria femoral principal. Tras dirigirse hacia la cara posterior del muslo, emite diferentes ramas que incluyen: las arterias femorales circunfleja lateral y medial, y otras ramas arteriales perforantes dirigidas a las diferentes áreas de irrigación muscular [144].

El aporte nervioso al músculo bíceps femoral consiste en: la cabeza corta es inervada por el nervio peroneo común, tras su bifurcación procedente del nervio ciático, mientras que la cabeza larga es inervada por la rama tibial del nervio ciático [144].

2.5- Estructura y composición del músculo esquelético

Al igual que el resto de músculos esqueléticos, se trata de una estructura orgánica compuesta por células musculares, red neurovascular organizada, y una MEC [84]. Se trata de una estructura organizada para que se lleve a cabo su función principal de movimiento articular y locomoción, así como para actuar de soporte durante el proceso de regeneración tras producirse un daño muscular. El elemento básico fundamental del músculo esquelético es la fibra muscular. El citoplasma de la fibra muscular, llamado sarcoplasma, contiene una matriz celular y orgánulos, entre los que se describen: mitocondrias, aparato de Golgi y retículo sarcoplásmico; gotas lipídicas, glucógeno y mioglobina [107]. Cuando se produce un daño muscular, las nuevas fibras en crecimiento contienen pocas mitocondrias, con lo que presentan una capacidad reducida para llevar a cabo un metabolismo aeróbico u oxidativo [24,118]. Por el contrario, en estadios de cicatrización más avanzados, se instaura un metabolismo aeróbico como la principal fuente de energía en el tejido muscular [118].

La fibra muscular esquelética es el producto de la fusión de múltiples mioblastos (células miogénicas precursoras) [107]. Las fibras musculares junto con su correspondiente rama nerviosa, son los componentes que se encargan de llevar a cabo la función contráctil del músculo [119]. La fibra muscular esquelética presenta un aspecto en forma de cinta, de longitud y grosor muy variable, dependiendo del músculo al que

pertenezca, y de su nivel de actividad respectivamente [127]. Por otro lado, el tejido conectivo le aporta el esqueleto de ensamblaje que organiza las células musculares y las estructuras neurovasculares, para que se lleve a cabo su función de forma correcta [119]. El endomisio es la capa de tejido conectivo que rodea de forma individualizada a la fibra muscular. Envolviendo a un fascículo o haz de fibras musculares se encuentra el perimisio. Por último, el epimisio es la capa de tejido conectivo externa que rodea al músculo esquelético [37,74] (**Figura 5**). Es importante remarcar que las fibras musculares se organizan de forma paralela u oblicua al eje largo del tejido muscular. Esta distribución y organización de las fibras es fundamental para que se lleve a cabo la función de forma eficiente [107].

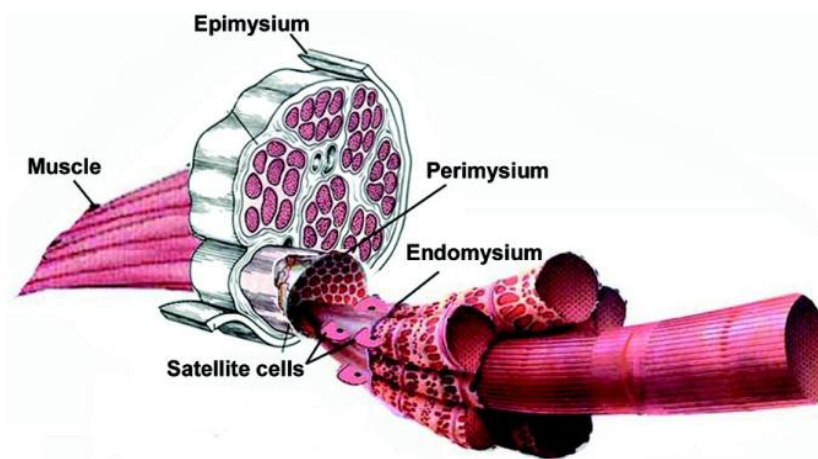


Figura 5: Esquema de la estructura del músculo esquelético normal.

El sarcolema es la membrana plasmática que rodea a cada fibra muscular. La lámina basal o membrana basal está compuesta por una capa interna, una capa intermedia o lúcida, y una capa externa o densa [84]. En la membrana basal se alojan multitud de proteínas entre las que destacan el colágeno, fibronectina, laminina, y numerosas glicoproteínas. Cada fibra muscular está compuesta por numerosos núcleos procedentes de los mioblastos en su origen, y se localizan en la periferia de la misma. Además, entre la lámina basal y la membrana plasmática, se localizan las células satélite, que juegan un papel fundamental en el proceso de regeneración muscular [111,119].

La función muscular está controlada por un nervio que se introduce en el tejido muscular esquelético a través del punto motor. Cada axón del nervio en cuestión emite

múltiples ramas, con el objetivo de que llegue un axón terminal a inervar cada fibra muscular. El punto en el cual cada axón terminal contacta con la fibra muscular, se denomina placa motora terminal de la unión neuromuscular [107]. La unión neuromuscular está compuesta por tres partes: el axón presináptico, la hendidura sináptica, y el área postsináptica de la fibra muscular. El conjunto formado por el axón nervioso y la fibra muscular a la cual inerva, constituyen lo que se denomina la unidad motora [74,107].

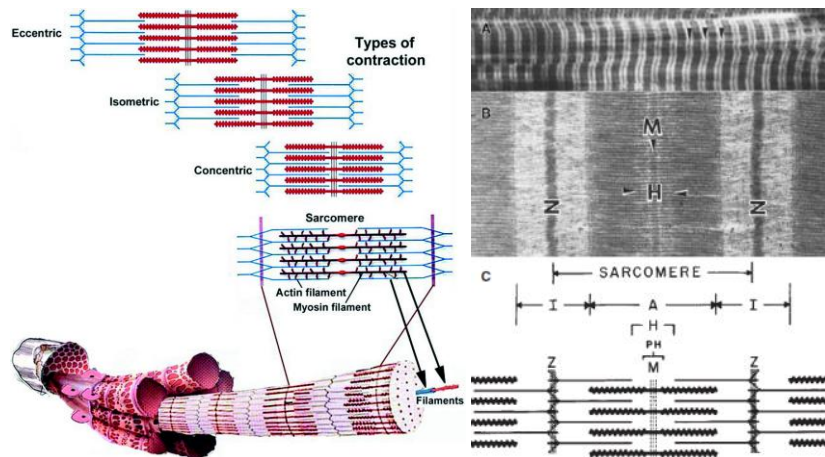


Figura 6: Esquema de la unidad contráctil denominada sarcómero. Los principales componentes del sarcómero son las proteínas fibrilares actina y miosina (**izquierda**). **A:** imagen representativa de diseño bandeado. **B:** fotografía de microscopio electrónico de músculo esquelético en vista longitudinal. **C:** representación esquemática del sarcómero (**derecha**).

Los filamentos contráctiles del músculo esquelético son fundamentalmente la actina y la miosina. Además, los miofilamentos contienen otras proteínas que participan en la unión de los filamentos primarios (actininas, proteínas de la línea M), o bien en la regulación de la interacción entre la actina y la miosina (tropomiosina, troponina). De esta manera, los filamentos delgados del músculo esquelético están compuestos por actina, troponina y tropomiosina. Por otra parte, los filamentos gruesos están compuestos por miosina, formada por dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras de aminoácidos [74]. Los miofilamentos se organizan de forma que en un corte longitudinal visto al microscopio electrónico se diferencia el diseño en bandas (**Figura 6**). Los miofilamentos gruesos contiguos y los miofilamentos delgados solapados forman la banda A. Los miofilamentos delgados no se extienden hacia el centro de la banda A, dejando una región más lúcida que se denomina banda H. Los miofilamentos

están interconectados debajo del centro de la banda H por lo que se denomina línea M. La línea M contiene miomesina, la cual une la línea M a la desmina, y creatinín-fosfoquinasa, que ayudará a mantener los niveles de ATP listos para que se produzca la contracción. La pseudo-zona H se encuentra a ambos lados de la línea M. En esta región, los miofilamentos gruesos no sobresalen, por lo que aparece una zona más electrolúcida (**Figura 6**) [74].

2.6- Histología del músculo esquelético

Los miocitos del músculo esquelético son células alargadas cuyo diámetro es de 10-110 μm y con una longitud que puede llegar a alcanzar los 50 cm [127]. Estas fibras musculares provienen de la fusión de varios mioblastos con un solo núcleo en el crecimiento del individuo joven, o durante la regeneración muscular tras un daño tisular en el individuo adulto [74]. En las fibras musculares en regeneración, los núcleos de los mioblastos presentan una localización central [107]. Como resultado de su unión, un solo miocito forma una fibra muscular que contiene múltiples núcleos de morfología ovalada, y localización periférica [107].

Cuando se observa un corte longitudinal en microscopía óptica, se muestra un patrón de estriaciones transversales dentro de la misma fibra muscular, alternando bandas claras y oscuras (**Figura 7**) [74]. En la sección histológica transversal, el miocito presenta una morfología angular, con un citoplasma punteado, debido a las miofibrillas que se alojan en su interior (**Figura 7**) [74]. Las miofibrillas del citoplasma son cilíndricas y de un diámetro de 1-2 μm . Las miofibrillas individuales están compuestas por miofilamentos gruesos y delgados que son los responsables de que se lleve a cabo la contracción muscular [74]. Las miofibrillas se alinean en sentido longitudinal, dando el aspecto de patrón en bandas descrito anteriormente en el miocito [74]. Los miofilamentos gruesos y delgados se solapan en la banda más oscura o banda A, mientras que los miofilamentos delgados se ubican solos en la banda más clara o banda I. Todas las miofibrillas dentro de una misma fibra muscular están conectadas por filamentos intermedios de desmina y vimentina [74].

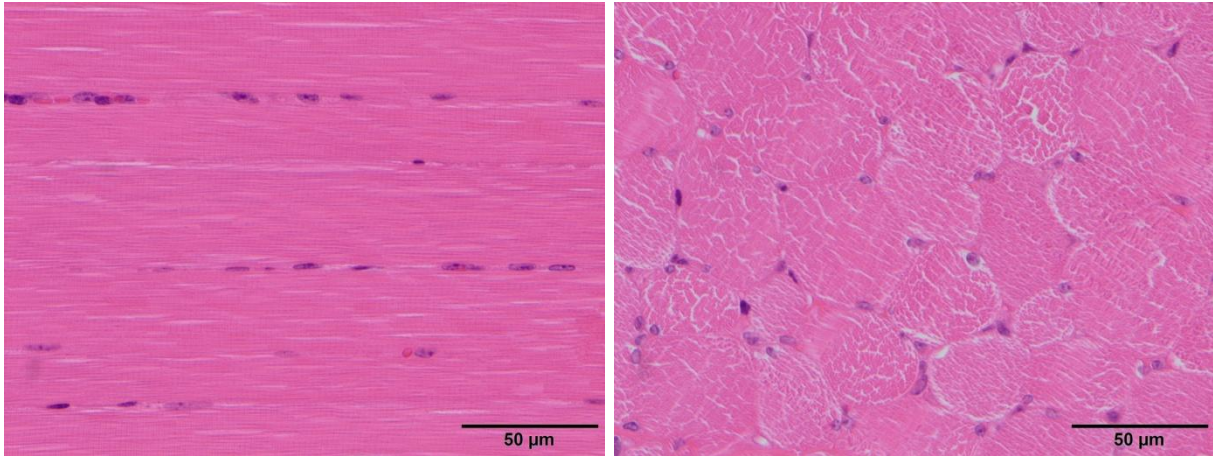


Figura 7. Imagen histológica representativa de un corte longitudinal en el músculo esquelético sano, con presencia de fibras musculares multinucleadas que alternan bandas claras y oscuras (**izquierda**). Imagen histológica representativa de un corte transversal en el músculo esquelético sano en el que se observan las fibras musculares de morfología angular, con el citoplasma punteado debido a las miofibrillas (**derecha**).

Las células satélite se localizan adyacentes a la membrana celular del miocito e incluidas en su membrana basal. Estas células representan una población de mioblastos en situación quiescente con una morfología alargada [56]. Su núcleo es heterocromático, al contrario que los núcleos de los miocitos de aspecto más claro [74]. Su función es tras su activación después de un daño muscular, proliferan rápidamente para generar celular progenitoras necesarias para la regeneración muscular [54,269].

El músculo esquelético normal no presenta infiltrado de células inflamatorias, a menos que se produzca una modificación brusca en su nivel de actividad, o por el contrario tenga lugar una rotura de las fibras musculares [251]. En este momento, se produce una invasión rápida y secuencial de células inflamatorias que puede persistir días o incluso varias semanas, mientras tiene lugar los procesos de reparación, regeneración y crecimiento de las fibras musculares [251].

Los miocitos de forma individual se agrupan en haces primarios o fascículos. Dentro de un fascículo, cada miocito está rodeado por fibras reticulares para formar el endomisio. Cada fascículo está rodeado por un tejido conectivo denso irregular, denomina perimisio. Por último se encuentra rodeando externamente a las estructuras anteriores como una densa capa irregular de tejido conectivo que se denomina epimisio [37,74]. La MEC de tejido conectivo está formado por una red de colágeno, glicoproteínas no colagénicas, proteoglicanos y elastina [244]. El colágeno es la

proteína que se presenta en mayor proporción en la MEC, siendo el colágeno tipo I y el colágeno tipo III los más abundantes [244]. Las diferentes capas de tejido conectivo están conectadas entre sí de manera que mantienen la integridad de su estructura para que se lleve a cabo la función muscular durante la contracción [244]. A nivel fisiológico, el tejido conectivo ayuda a la regulación de varios procesos celulares como el crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y adhesión [244].

2.7- Rotura aguda del tendón de Aquiles

Las patologías tendinosas suponen un 30-50% de las causas de morbilidad de origen músculo-esquelético, hecho que afecta tanto al ámbito deportivo profesional, como al público en general [6,120,132]. Dentro del colectivo de patologías de tendón, destaca la rotura aguda total o parcial del tendón de Aquiles como una lesión grave que incapacita al paciente de forma temporal, o incluso permanente para la vuelta a la realización de ciertas actividades como la práctica profesional del deporte [72,82]. Tradicionalmente, esta patología ha sido descrita en el paciente adulto joven. Sin embargo, se está registrando un aumento en su incidencia en general, y en personas de mayor edad, en particular, asociado al elevado nivel de actividad física, y a la prolongación de la esperanza de vida actual [82,105,188].

La elección del tratamiento más adecuado para esta patología a veces no supone una decisión fácil para el clínico [121]. De forma muy frecuente, cuando se produce una rotura total, se lleva a cabo una tenorrafia quirúrgica mediante técnica abierta, o con el uso de técnicas mínimamente invasiva [3]. Por otro lado, con el avance en las diversas técnicas de tratamiento conservador, se están registrando resultados cuanto menos comparables a la aproximación quirúrgica en ciertos casos, teniendo en cuenta en todo momento la etiología asociada a la ruptura y la cronicidad de la lesión [72].

De cualquier modo, el objetivo final de la terapia utilizada, es que se produzca de forma correcta y exitosa el proceso de cicatrización tendinosa, cuyas fases paso a describir de forma detallada a continuación.

2.7.1- Cicatrización tendinosa

Dependiendo del origen de las células partícipes en el proceso, y el mecanismo que se desencadena tras un daño tendinoso, la cicatrización se clasifica como: cicatrización intrínseca y cicatrización extrínseca [103,115,192,235].

1- Cicatrización extrínseca: se basa en la hipótesis de que los fibroblastos y células inflamatorias que acuden de forma secuencial al foco lesional proceden de tejidos periféricos, que tras invadir el tejido dañado, inician y promueven a continuación las diversas fases de cicatrización que detallaremos a continuación [115].

2- *Cicatrización intrínseca*: en esta aproximación a la reparación del tejido tendinoso se producen diversos mecanismos que incluyen la migración y proliferación celular desde el endotenon y epitenon hacia el foco dañado. A continuación, estas células establecen una matriz extracelular con su correspondiente red vascular integrada [115].

Bien es cierto que en la mayoría de los casos tienen lugar ambos mecanismos de cicatrización, dependen de diversos factores como la localización y extensión del tejido dañado, la presencia de vaina sinovial, así como la movilidad de la estructura tendinosa tras la intervención [143]. Los mecanismos extrínsecos se activan de forma más temprana que los intrínsecos, y son los responsables de la formación de adherencias, la aparición de matriz de colágeno altamente desorganizada y con elevada densidad celular, y además con una elevada cantidad de agua en el tejido de reparación, impropia de un tendón sano [115]. A nivel funcional, el tejido cicatricial resultante va a dar lugar a alteraciones en el deslizamiento fisiológico durante su biomecánica [103]. Por el contrario, los mecanismos intrínsecos son los responsables de la reorganización de las fibras de colágeno, así como el mantenimiento de la continuidad fibrilar [115]. Esto resulta en un tendón con mejores propiedades biomecánicas y consecuentemente, un menor porcentaje de complicaciones tras la cicatrización del tejido dañado [235].

2.7.1.1- *Fases de la cicatrización tendinosa*

Tras producirse un daño agudo en el tendón, se activa una cascada de fenómenos inflamatorios, responsables del comienzo del proceso de cicatrización. La reparación tendinosa consta de varias fases que cronológicamente se solapan entre sí. La duración de cada fase puede variar dependiendo del lugar y tipo de lesión, así como el tratamiento que se esté llevando a cabo. Estas fases se describen como: fase inflamatoria, fase proliferativa y fase de remodelación [103,235].

a) Fase inflamatoria

En la fase inicial tras el daño tisular, tanto eritrocitos, procedentes de la discontinuidad producida en los vasos sanguíneos, como células inflamatorias, principalmente neutrófilos, entran en el foco lesional [45,172]. La agregación plaquetaria provoca la formación de un hematoma en el foco de la lesión, y además tiene lugar la liberación de mediadores pro-inflamatorios, y exposición de moléculas de

adhesión [103]. Durante las primeras 24h, las células predominantes son neutrófilos, que junto con los macrófagos posteriormente, llevarán a cabo su función principal de eliminar por fagocitosis el material necrótico dañado. Los macrófagos se encargarán a continuación de romper y resolver el coágulo de sangre que se originó durante las primeras horas. A partir de entonces se comienzan a liberar factores de crecimiento proangiogénicos, para la posterior formación de una red capilar [103]. La importancia de restablecer un árbol vascular en el tejido en formación, radica en la necesidad de transporte de oxígeno al foco dañado, con el objetivo de que se lleve a cabo la síntesis de colágeno, proceso que se considera altamente dependiente de oxígeno [86]. Posteriormente, la concentración de neutrófilos disminuye, y la población de células inflamatorias mononucleares (macrófagos primeramente y luego linfocitos) son las que permanecerán en el foco de lesión hasta que se resuelva la fase inflamatoria. La concentración de neutrófilos puede persistir hasta 7 días tras la lesión, y la de macrófagos hasta 14 días desde el comienzo de dicha fase cicatricial [173]. Además, se produce la liberación de multitud de factores quimiotácticos, con un aumento de la permeabilidad vascular, inicio de fenómenos de angiogénesis, estimulación de proliferación de tenocitos, y finalmente el reclutamiento de más células inflamatorias [235]. Una función a destacar en el papel de los macrófagos sobre la cicatrización tendinosa, es que tras su activación, tienen la capacidad de liberar multitud de factores de crecimiento biológicamente activos, que inducen la síntesis de MEC, inhiben la degradación de dicha matriz, y estimulan la atracción y proliferación de los fibroblastos y otras células progenitoras que se encargaran de reparar el tejido lesionado [60,80,113,149].

b) Fase proliferativa

Solapada con la fase inflamatoria, durante este período se mantiene el reclutamiento de fibroblastos al foco lesional, que se encargarán de la síntesis de diversos componentes de la MEC, como colágeno y proteoglicanos [115,156]. Esta matriz inicialmente se organiza de forma aleatoria en el espacio extracelular. El componente principal en este momento es el colágeno tipo III [156]. Con el transcurso de la cicatrización tendinosa, se produce una conversión gradual de colágeno tipo III a colágeno tipo I [156]. Además, el contenido de agua y glicosaminoglicanos se mantiene elevado durante esta fase de reparación. A nivel tisular, se observa una red compleja de vasos sanguíneos, y la zona lesionada se presenta con un aspecto macroscópico de

cicatriz tisular [75]. Al final de la fase proliferativa, el tejido de reparación se presenta con una alta densidad celular, con abundante cantidad de componentes de la MEC [115].

c) Fase de remodelación

La remodelación tisular comienza a las 6-8 semanas después del daño tendinoso [235]. Esta fase cicatricial se caracteriza por una disminución en la celularidad, una reducción en el ritmo de síntesis de matriz extracelular, disminución en la síntesis del colágeno tipo III, y un aumento en la síntesis de colágeno tipo I [115,156]. Las fibras de colágeno tipo III son reabsorbidas por las enzimas colagenasa, de forma que se reemplaza el colágeno tipo I por colágeno tipo III [103]. Se produce un alineamiento progresivo de las fibras de colágeno y su organización en haces. Estas fibras de colágeno tipo I están organizadas longitudinalmente a lo largo del eje de carga del tendón, y son las responsables del soporte biomecánico en el tejido tendinoso neoformado [160]. Además, a nivel histológico se produce un cambio gradual del componente predominantemente celular, a un tejido principalmente conectivo o fibroso [103]. Las células grandes, de aspecto redondeado que predominan en las fases anteriores de reparación tras producirse el daño tisular, se convierten de forma paulatina en células con aspecto alargado hasta constituir los tenocitos maduros del tendón normal no dañado [197]. Durante la fase final de remodelación, se produce la maduración del tejido, y con ello la creación de enlaces entre las diferentes unidades funcionales de moléculas de colágeno, que aportarán la rigidez propia de tendón, y consecuentemente una mayor fuerza de tensión [103,160]. Por otro lado, se produce una disminución de la vascularización del tejido, y una disminución del ritmo metabólico de los tenocitos [5]. Sin embargo, hasta la actualidad, se conoce que el tejido neoformado nunca logra alcanzar las características de un tendón normal que nunca ha sido dañado [103,115].

2.8- Rotura muscular aguda

El daño muscular es una de las patologías más frecuentes en el mundo del deporte, suponiendo sobre un 35% de todas las lesiones descritas en este ámbito, y siendo particularmente habitual la rotura parcial de los músculos isquiotibiales [7,73,93].

Existen diferentes escalas de clasificación de las lesiones musculares, todas ellas basadas en el porcentaje de fibras musculares dañadas con respecto a la totalidad del músculo en cuestión. Basándose en la ecografía como método de diagnóstico de una rotura muscular, MS et al. [190] diseñaron una escala de clasificación de grado 0 a 3, correspondiéndose desde un aspecto ecográfico normal a una interrupción de la totalidad de las fibras musculares, respectivamente (**Tabla 1**).

Grado	Descripción ecográfica
0	Sin alteración remarcable
1	Sólo edema muscular
2a	Rotura parcial de las fibras musculares (<33%)
2b	Rotura parcial de las fibras musculares (≥ 33 -66%)
2c	Rotura parcial de las fibras musculares (≥ 66 -99%)
3	Rotura muscular completa

Tabla 1. Escala de clasificación de una rotura muscular basada en la ecografía como método de evaluación

Este tipo de lesiones musculares en la musculatura isquiotibial no sólo son extremadamente frecuentes, sino que además presentan un ritmo de aparición de lesiones recurrentes de un 16-31% [170]. Es por ello por lo que se persigue un doble objetivo en el tratamiento de una rotura muscular: por una parte, provocar una aceleración en el proceso de reparación muscular, y por otra, disminuir la cantidad de fibrosis asociada a la cicatrización muscular, la cual está directamente relacionada con la aparición de lesiones recidivantes [7,83].

La terapia convencional descrita en una rotura muscular de grado II, consiste en la actuación inmediata tras producirse la lesión, siguiendo los principios que reúne las iniciales **R.I.C.E.** (**Rest**: reposo; **Ice**: crioterapia; **Compression**: compresión;

Elevation: elevación). Además, desde la primera semana tras producirse la lesión, se instaure un protocolo de fisioterapia adecuado para el paciente y la zona muscular afectada [119]. Ante los resultados no deseados con el uso de la terapia convencional, se han propuesto otras alternativas para el tratamiento de una rotura muscular de grado II, entre las que se encuentra el uso de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) [7], que se detallará en el apartado 2.12 de la revisión bibliográfica de la presente tesis doctoral.

2.8.1- Cicatrización muscular

La cicatrización del músculo esquelético sigue un patrón constante independientemente de la causa que provocó el daño tisular (contusión, distensión o laceración) [109]. En este proceso se identifican 3 fases [119]:

1- *Fase de destrucción*: se caracteriza por la rotura y consiguiente necrosis de las fibras musculares, la formación de un hematoma en los muñones terminales de las fibras dañadas, y la reacción celular inflamatoria [119].

2- *Fase de reparación*: consiste en la fagocitosis del tejido necrótico, la regeneración de las fibras musculares, y la producción de una cicatriz de tejido conectivo, así como el crecimiento de los vasos sanguíneos hacia el área dañada [119].

2- *Fase de remodelación*: se produce la maduración de las fibras musculares regeneradas, la contracción y reorganización del tejido cicatricial, y la recuperación de la capacidad funcional [119].

A continuación se procede al desarrollo de cada una de las fases de forma más detallada. Debido al solapamiento cronológico, mayoritariamente de las dos últimas fases, se procederá a su descripción detallada de forma conjunta.

2.8.1.1- Fases de la cicatrización muscular

a) Fase de destrucción

Tras producirse una contusión muscular, una distensión excesiva del músculo en cuestión, o bien una laceración, tiene lugar una rotura de las fibras musculares, a partir de lo cual se desencadena el comienzo de la primera fase de reparación muscular [91].

Cuando se produce la rotura de la fibra muscular, se abre un espacio entre ambos muñones [119]. En este momento se inicia la necrosis en el extremo fibrilar más distal, que se extenderá hasta una estructura específica de la fibra muscular, denominada banda de contracción. La banda de contracción no es más que una estructura formada como resultado de la condensación del citoesqueleto, que actúa a modo de “cortafuegos” [109]. Horas después del daño, se interrumpe la propagación de la necrosis hacia la zona de músculo no dañado, a través del acordonamiento de la banda de contracción a modo de barrera protectora en la membrana plasmática. A partir de este punto, se comienza la reparación de la membrana plasmática dañada [109].

Además, a lo largo de las fibras musculares dañadas, se rompen los vasos sanguíneos, de modo que se libera su contenido dando lugar a la formación de un hematoma, y a que gran cantidad de células inflamatorias alcancen el foco de la lesión de forma directa [119,250-252]. La respuesta inflamatoria se ve amplificada cuando por una parte, las células satélite, y por otra, el extremo de fibra muscular necrótica, liberan multitud de citoquinas que actúan de forma quimiotáctica, y provocan una mayor extravasación de células inflamatorias [251].

Durante el estadio más temprano de reparación muscular, durante las primeras 24h, los leucocitos polimorfonucleares son las células más abundantes en el foco de lesión. Ya en el primer día comienzan a ser reemplazadas por células inflamatorias de la estirpe monocítica [250].

b) Fases de reparación y remodelación

Los monocitos del torrente sanguíneo, cuando infiltran el tejido afectado se convierten en macrófagos, cuya función primaria será de proteólisis y fagocitosis del tejido necrótico mediante la liberación de enzimas lisosomales [250]. El fenómeno de fagocitosis es un proceso altamente específico del tejido necrótico, de manera que se mantiene intacta la membrana basal que rodea a las fibras musculares dañadas, sirviendo de andamiaje guía para que las células satélite comiencen la formación de nuevas fibras musculares [91,109,111].

Por otro lado, los macrófagos que alcanzan el foco de la lesión, junto con los fibroblastos activos, se encargan de producir una señal quimiotáctica adicional mediante la liberación de factores de crecimiento y citoquinas biológicamente activas. A ello se añaden los factores de crecimiento que se alojan de forma inactiva en la MEC, y que se

activan para liberarse tras un daño muscular [119]. De esta forma, los factores de crecimiento unidos a la matriz extracelular juegan un papel muy importante en el comienzo de los procesos de reparación tisular [205]. Esto se explica de forma que tras la inhibición del Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) durante la regeneración del músculo esquelético dañado, se produce un déficit remarcable en la recuperación de dicha musculatura [261]. En esta misma línea, se ha descrito un aumento en la expresión de numerosos factores de crecimiento y citoquinas biológicamente activas durante la reparación muscular tras producirse un daño. Estos son: bFGF, IGF, TGF- β , HGF, IL-1 β , IL-6, PDGF [119]. Teniendo en cuenta que estos factores de crecimiento son potentes activadores mitogénicos de numerosas estirpes celulares, se puede deducir que igualmente están involucrados de una forma crucial en los procesos de regeneración muscular tras producirse un daño en el tejido [30,54]. De hecho, los arriba mencionados péptidos activos se consideran activadores de proliferación y diferenciación de las células satélite hacia la formación de miotúbulos multinucleados en un estadio más tardío de la reparación muscular [54].

Una vez se elimina el tejido necrótico, comienzan dos procesos simultáneos y competitivos de síntesis de las fibras musculares y axones dañados, y la formación de una cicatriz de tejido conectivo [119]. La progresión de ambos procesos de síntesis de forma balanceada, es un requisito indispensable para que se produzca la recuperación óptima de la función muscular contráctil [109,127].

2.8.2- Regeneración de las fibras musculares

Los miocitos se consideran células indivisibles tras su diferenciación para formar las fibras musculares. A pesar de esto, el músculo esquelético presenta un mecanismo de regeneración intrínseco que le aporta gran capacidad de reparación al tejido muscular tras producirse un daño. Para ello, existe una población de células indiferenciadas, llamadas células satélite, que están ubicadas debajo de la membrana basal de cada fibra muscular [71,111,119]. De esta manera, cuando tiene lugar la pérdida de continuidad en el tejido, las células satélite en primera instancia proliferan, luego se diferencian a mioblastos, y finalmente se unen unas a otras para formar los miotúbulos que contienen varios núcleos localizados en el centro de la fibra muscular en regeneración [111,119]. A continuación, los miotúbulos neoformados se unen a la parte

de la fibra muscular dañada que ha sobrevivido a la fase de destrucción inicial en el proceso de reparación [111,119]. Finalmente, la nueva fibra muscular adquiere su aspecto estriado maduro, con los diferentes núcleos localizados en la periferia [111,119].

En el tejido muscular esquelético maduro, las células satélite se encuentran quiescentes o en reposo, y se caracterizan por la expresión de la proteína Pax7. Tras producirse un daño muscular, se activa esta población celular de manera que van a expresar los factores reguladores miogénicos (FRM) Myf5 y MyoD1, y es cuando pasan a denominarse mioblastos. Estas células proliferan de forma masiva con el objetivo de generar todas las células miogénicas necesarias para reconstituir el tejido muscular dañado [111,269]. Desde un punto de vista cronológico, el FRM de expresión más temprana es el MyoD1, ya que se ha detectado desde las primeras 12 h en condiciones *in vitro* [241]. A continuación, el Myf5 comienza su expresión a las 48 horas, estando asociado junto con el MyoD1 a un aumento del estímulo de proliferación de las células satélite [241]. Ya a partir de las 72h, los mioblastos aumentan la expresión de otros FRM como la Miogenina (Myog) [241]. A partir de este momento, comienza la diferenciación de los mioblastos a miocitos, para entrar a formar parte de las fibras musculares que se están regenerando [71].

La Miostatina (Mstn) es un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético, que pertenece a la superfamilia TGF- β [142]. Existen diversos estudios que demuestran el poder inhibidor de la Mstn sobre la regeneración muscular, así como su función reguladora sobre la fibrosis en el músculo esquelético [180,184,233].

Tras producirse un daño muscular, las células satélite se activan no sólo para diferenciarse hacia la formación de nuevas fibras musculares, sino también para multiplicarse y mantener de esta manera su propia población celular [71]. De este modo, se ha observado que tras múltiples traumatismos llevados a cabo de forma experimental, la población de células satélite se mantiene constante [239]. En esta línea, se ha descrito en varias ocasiones que la población de células satélite está dividida a su vez en dos subpoblaciones: una de ellas es la encargada de su diferenciación hacia células de la estirpe miogénica, y la otra son aquellas que se encargarán de multiplicarse para autoabastecer la población de células satélite [27,48,71,146].

Cuando los cilindros de la membrana basal antigua, que no han sido fagocitados en la fase anterior, se rellenan de las fibras musculares en regeneración, en su conjunto se extienden hacia el centro del foco de la lesión, donde se ha formado una cicatriz de tejido conectivo entre ambos muñones [109,119]. Las fibras musculares en regeneración intentan perforar el tejido conectivo por ambos lados de la cicatriz [109]. Sin embargo, se describe que tras el escaso avance a través del tejido cicatricial, las fibras musculares comienzan a crear enlaces de unión al tejido conectivo, formando una especie de unión músculo-tendinosa [255]. Con el tiempo, la cicatriz muscular disminuye progresivamente, de manera que se produce un acercamiento entre los extremos de las fibras musculares dañadas. Aún no se sabe a ciencia cierta si a largo plazo, o mediante el empleo de ciertas estrategias terapéuticas, las fibras musculares de uno y otro extremo se unirán finalmente entre sí, llegando a desaparecer la cicatriz de tejido conectivo que se interpone entre ellas en forma de septo [255].

2.8.3- Formación de tejido conectivo cicatricial

Con la organización del hematoma que se ha formado durante las primeras horas, la fibrina y fibronectina procedente de la sangre se unen para formar un tejido de granulación temprano, que hace de MEC inicial para actuar de andamiaje y punto de anclaje de los fibroblastos que invadirán posteriormente (algunos de ellos procedentes de la diferenciación de células de la estirpe miogénica) el espacio entre los extremos de las fibras musculares rotas [109,154]. A continuación, los fibroblastos comienzan a llevar a cabo la síntesis de proteínas y proteoglicanos de la MEC con el objetivo de restaurar la integridad de la estructura del tejido conectivo que el músculo presentaba previo a la lesión [119]. En primer lugar se sintetizan la tenascina-C y fibronectina, que formarán moléculas de mayor tamaño con propiedades altamente elásticas y con capacidad de adhesión [127]. A continuación, comienza la expresión de colágeno tipo III, y por último, un par de días más tarde, se inicia la síntesis de colágeno tipo I, que se mantendrá hasta varias semanas después de producirse el daño tisular [127]. El tejido de granulación inicialmente grande que se interpone entre ambos muñones de fibras musculares, se condensará de forma eficiente y progresiva hasta formar una masa pequeña de tejido conectivo, principalmente formado por colágeno tipo I [127]. Durante la cicatrización del músculo esquelético no se produce un incremento del tejido

conectivo intramuscular, a menos que se mantenga el músculo afectado inmovilizado durante un largo período de tiempo [127].

El tejido conectivo que se interpone entre las fibras musculares regeneradas, supone el punto más débil del músculo recientemente reparado [109,126]. Se calcula que unos 10 días después de producirse la rotura muscular es cuando el tejido conectivo cicatricial alcanza su mayor grado de madurez, y a partir del cual no supone el punto más débil [126]. Posteriormente, cuando se somete a una fuerza externa sobre el músculo en cuestión hasta provocar una rotura, esta se produce normalmente en el tejido muscular adyacente a la cicatriz previamente formada [126]. Esto se traduce en una posible alteración de la funcionalidad muscular normal, debido a la interposición de una cicatriz fibrosa entre ambas porciones del vientre muscular, y una mayor predisposición a sufrir lesiones musculares recidivantes en el tejido regenerado o colindante al anterior [119]. El TGF- β 1 es un factor de crecimiento que se ha asociado con la formación de una cicatriz fibrosa en diversos órganos, entre ellos el músculo esquelético [36,155]. El uso de inhibidores del TGF- β 1, como el decorin y suramin inhiben la formación de una cicatriz en el tejido muscular dañado [53,102]. Además, un estudio en el que se utilizó PRP en combinación con un inhibidor del TGF- β 1 para estimular la reparación muscular, se produjo una aceleración en la regeneración muscular, y una mejoría en la calidad del tejido muscular regenerado, con una menor cantidad de fibrosis [152].

2.8.4- Vascularización del músculo dañado

La restauración del aporte sanguíneo al área dañada supone un requisito indispensable para que se lleve a cabo la regeneración morfológica y funcional del músculo dañado [116-117]. Los nuevos capilares proceden de los vasos sanguíneos de mayor calibre que han sobrevivido a la lesión, y se dirigen hacia el centro de la zona lesionada para asegurar el aporte de oxígeno, y consecuentemente permitir que tenga lugar un metabolismo aeróbico en las fibras musculares en regeneración [119]. Los miotúbulos neoformados presentan una baja densidad de mitocondrias, y como consecuencia una capacidad moderada de metabolismo aeróbico, por lo que llevan a cabo mayoritariamente un metabolismo anaeróbico [119]. Sin embargo, durante los estadios finales de regeneración, un metabolismo aeróbico constituye la principal fuente de energía en las fibras musculares multinucleadas [119]. Esto explica además la causa

por la cual la regeneración de las fibras musculares no progresa sobre los miotúbulos neoformados delgados, a menos que haya un adecuado aporte de sangre a través de los capilares neoformados, y se asegure de esta manera el aporte de oxígeno requerido para que se lleve a cabo un metabolismo aeróbico [116,119].

2.8.5- Regeneración de los nervios intramusculares

Para que se lleve a cabo la regeneración muscular con éxito, es necesario que de forma simultánea se desarrollen los nervios intramusculares [110,206]. En caso de ausencia de estímulo nervioso, se produciría la regeneración de la fibra muscular de forma normal, pero posteriormente tendría lugar la atrofia de la misma sin un efecto funcional para el individuo [206]. En caso de denervación neurogénica por rotura del axón, para que se lleve a cabo la reinervación de la fibra muscular neoformada, será necesario que se produzca el crecimiento axonal en dirección distal hacia el centro de la rotura, y hacia donde se está llevando a cabo la regeneración muscular [206]. Teniendo en cuenta que los axones se rompen normalmente incluidos o muy cercanos al músculo, el contacto entre axón y fibra muscular se restablece de forma rápida [119].

2.9- Las plaquetas: origen, estructura y función en la cicatrización tisular

2.9.1- Origen de las plaquetas

Los megacariocitos son las células precursoras directas de las plaquetas que se localizan de forma primaria en la médula ósea [2]. La médula ósea está dividida en dos entidades anatómicas respecto al desarrollo de células hematopoyéticas: zona endóstica, donde residen las células madre sin capacidad de división, y un nicho vascular localizado en la zona central, que promueve la diferenciación de células madre, y la movilización de células hematopoyéticas maduras hacia el torrente sanguíneo [232]. En la médula ósea, las células endoteliales juegan un papel fundamental en la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas como consecuencia del contacto directo y la liberación de citoquinas. Se sabe que los megacariocitos promueven la secreción de factores de supervivencia y de crecimiento [232].

Las células precursoras plaquetarias directas o megacariocitos sufren un proceso de maduración en el que se fragmentan en la circulación pulmonar de la mayoría de los mamíferos [43]. Este fenómeno involucra varias fases hasta llevar a cabo la formación de proplaquetas o plaquetas inmaduras:

- Endomitosis: en estadíos tardíos de desarrollo de los megacariocitos comienzan a realizar diversos procesos de endomitosis en las cuales no tienen lugar la anafase, telofase y posterior formación celular [258]. El resultado son megacariocitos maduros, que se describen como células poliploides cuya cantidad de material genético está directamente relacionado con el número de plaquetas que un megacariocito es capaz de producir. La razón por la cual un megacariocito se divide de forma atípica para dar lugar a las plaquetas, es debido a la falta de formación de un huso mitótico funcional durante el proceso [112].

- Demarcación del sistema de membrana y formación de proplaquetas: la diferenciación final de los megacariocitos ocurre tras la finalización de la endomitosis, y está asociada con invaginación tubular de la membrana plasmática, resultando en la demarcación del sistema de membrana, que delimitará a las proplaquetas o plaquetas todavía inmaduras [225]. La síntesis de los gránulos plaquetarios tiene lugar de forma simultánea con la formación del sistema de membrana. Una vez los gránulos son empaquetados, se movilizan a través de los microtúbulos durante su ensamblaje para formar proplaquetas [213]. Además, en el citoplasma de estas células aún inmaduras, se

almacena pre-ARN-mensajero, de manera que adoptan desde este momento la capacidad de formar proteínas [213]. La formación de proplaquetas a partir del megacariocito comienza en la periferia y de forma centrípeta hacia el núcleo. Una vez llegado aquí, el núcleo resultante entra en muerte celular programada o apoptosis [125].

2.9.2- Estructura plaquetaria

Membrana celular:

La membrana plaquetaria es similar a la de otras células y está constituida por una bicapa lipídica cuyo interior está compuesto por un núcleo hidrofílico. Estos lípidos de membrana están principalmente formados por esfingolípidos y moléculas de colesterol, con infiltración de proteínas de membrana. Los lípidos de membrana tienen la capacidad de movilidad lateral y mejorar la señal en fases iniciales de activación plaquetaria, así como mejorar la reorganización del citoesqueleto, fenómeno fundamental para llevar a cabo la retracción del coágulo [42].

Por otra parte, tanto en la cara externa, como infiltrados en la bicapa lipídica, se ubican los receptores de membrana plaquetaria, fundamentalmente proteínas y glicoproteínas que juegan un papel crucial en la detección y transmisión de señales externas de la células, para que se lleve a cabo su función en el tiempo y de la forma adecuada [34].

Estructura citoplasmática y elementos membranosos:

Microtúbulos: justo debajo de la membrana plaquetaria se describe una banda circunferencial de microtúbulos [100]. Los microtúbulos son estructuras cilíndricas huecas compuestas por protofilamentos que siguen un patrón helicoidal. Los microtúbulos son los responsables del mantenimiento de la morfología celular de disco que presentan las plaquetas en circulación. Bajo condiciones fisiológicas normales, la tubulina β -1 es únicamente expresada como componente de los microtúbulos en el interior de los megacariocitos, y juega un papel importante en la fragmentación ordenada del citoplasma del megacariocito en la formación de plaquetas [226].

Sistema canalicular abierto: es un laberinto tortuoso formado por un conjunto de canales interconectados entre sí y unidos a la superficie de membrana, extendiéndose en

profundidad en el citoplasma. Este sistema puede actuar como un conducto para la incorporación de partículas desde el entorno celular, así como para poder llevar a cabo la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios del citoplasma tras producirse la activación plaquetaria [265].

Sistema tubular denso: se trata de un remanente del retículo endoplásmico liso del megacariocito localizado cerca de los microtúbulos. Al contrario que el sistema canalicular abierto, el sistema tubular denso no está comunicado ni con la membrana plasmática ni con los gránulos citoplasmáticos. Este orgánulo contiene ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa, por lo que participa en la síntesis de prostaglandinas. Además constituye el punto de almacenamiento de calcio a nivel intracelular. El movimiento de este calcio es facilitado por la bomba ATPasa conectada a otra bomba homónima ubicada en la membrana celular [145].

Mitocondria: orgánulo encargado de mantener los niveles de energía para soportar los requerimientos metabólicos durante la función plaquetaria en los fenómenos de agregación y secreción. La caída del potencial de membrana mitocondrial está asociada con el envejecimiento de las plaquetas en circulación [199].

Citoesqueleto:

Al igual que la gran mayoría de células del organismo, las plaquetas contienen un citoesqueleto ubicado en la cara citoplasmática de la membrana celular, compuesto por diversas proteínas entre las que se describen: actina, espectrina, anquirina, filamina y glicoproteína Ib-IX-V (receptor del Factor de Von Willebrand). La membrana del citoesqueleto interactúa con una extensa red citoplasmática de actina, con el objetivo de que las plaquetas lleven a cabo su función [42].

Gránulos:

Las plaquetas contienen en su citoplasma 3 principales tipos de gránulos: densos, lisosomales y alfa, que son heterogéneos en contenido y en morfología [140].

Densos: como su propio nombre indica, son vesículas celulares ubicados en el citoplasma plaquetario, que cuando son observados en el microscopio electrónico, se aprecian como estructuras electrodensas. Estos orgánulos se encargan de almacenar diferentes componentes metabólicamente activos, como son nucleótidos de adenina

(ADP/ATP), serotonina, calcio y fosfatos inorgánicos. En cuanto al calcio se refiere, se estima que se almacena en estas vesículas hasta un 70% del calcio total en el interior de las plaquetas. Este calcio no se moviliza durante la activación plaquetaria, al contrario que aquel que se almacena en el sistema tubular denso descrito anteriormente [181]. En estudios moleculares se han descrito hasta 40 tipos diferentes de proteínas alojadas en los gránulos plaquetarios densos. Estas moléculas se categorizan de la siguiente manera: proteínas de señalamiento celular, proteínas chaperonas, proteínas componentes del citoesqueleto, proteínas que participan en la glucólisis, y proteínas que participan en la función plaquetaria [101]. Por otra parte, se describen proteínas de membrana que actúan como receptores, fundamentales para que se lleve a cabo la liberación de su contenido al unirse a receptores de la membrana plasmática plaquetaria [42].

Lisosomales: son orgánulos vacuoliformes que contienen fundamentalmente enzimas hidrolíticas ácido-dependientes, por ejemplo: glucosidasas, proteasas y lipasas [64]. La membrana lisosomal contiene de la misma manera proteínas que son liberadas al exterior en la reacción de liberación plaquetaria. Estas proteínas de membrana presentan la particularidad de estar altamente glicosiladas, con el objetivo de autoprotegerse frente a las enzimas hidrolíticas almacenadas en el interior de los gránulos. Otra función fundamental de estas moléculas, es la del transporte de iones y aminoácidos a través de la membrana, necesario para mantener en el interior un pH ácido [114,186].

Alfa: de los tres tipos de gránulos plaquetarios vacuoliformes, son los más grandes y numerosos del citoplasma. Se caracterizan por ser gránulos azurófilos, con una estructura específica y que desempeñan un papel fundamental en el almacenamiento de multitud de proteínas biológicamente activas (**Tabla 2**). Desde un punto de vista estructural, los gránulos alfa se dividen en dos compartimentos fundamentales: una zona central oscura o nucleóide, y una zona periférica luminiscente a los electrones, gris o región de la matriz, que pueden observarse al microscopio electrónico. La compartimentalización de estos gránulos α puede estar explicada para permitir a la plaqueta la secreción de diferentes proteínas en respuesta a un estímulo determinado [227]. Teniendo en cuenta el contenido de estos gránulos plaquetarios, se describen 2 grupos de proteínas: aquellas sintetizadas por los megacariocitos, y las proteínas que han sido incorporadas desde el exterior por endocitosis en el torrente circulatorio. Las proteínas sintetizadas en los megacariocitos se dividen a su vez en dos categorías:

proteínas específicas de los megacariocitos (como β -tromboglobulina y el factor plaquetario 4), y aquellas que son sintetizadas por otras células pero están concentradas en el interior de los gránulos α plaquetarios (como el factor V y el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas: PDGF). Este último grupo de proteínas se suele referir a las proteínas selectivas de plaquetas. La conocida proteína que se incorpora a la plaqueta por endocitosis es el fibrinógeno, por mediación del receptor de la glicoproteína IIb-IIIa. Las proteínas presentes en bajos niveles en el interior de los gránulos α como la albúmina e inmunoglobulinas, se incorporan a las plaquetas de forma pasiva, sin requerir la presencia de receptores específicos de membrana. Un análisis molecular de la composición de los gránulos alfa plaquetarios humanos describió una lista de 284 proteínas, 44 de las cuales no habían sido previamente identificadas en el interior de estos orgánulos vacuoliformes [177].

Tipo	Moléculas
Moléculas de adhesión	P-selectina, Factor de Von Willebrand, Trombospondina, Fibrinógeno, Integrina α Ib β 3, Integrina α v β 3, Fibronectina
Citoquinas	Proteína plaquetaria básica [Factor plaquetario 4 y su variante (CXCL4) y β -trombomodulina], CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL17, CXCL1 (crecimiento regulado por oncogén α), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8)
Factores de coagulación	Factor V, Multimerina, Factor VIII
Factores fibrinolíticos	α ₂ -Macroglobulina, Plasminógeno, Activador-inhibidor del plasminógeno 1
Factores de crecimiento y mitogénicos	Factor de crecimiento fibroblástico básico, Factor de crecimiento epidérmico, Factor de crecimiento derivado de los hepatocitos, Factor de crecimiento insulínico-1, Factor de crecimiento transformante- β , Factor de crecimiento del endotelio vascular A, Factor de crecimiento del endotelio vascular C, Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
Moléculas inmunológicas	B1H Globulina, Factor D, Inhibidor cl, IgG
Otras proteínas	Albumina, α ₁ -Antitripsina, Gas6, Glicoproteína rica en histidina, Kininogen de alto peso molecular, Proteasa nexin-II osteonectina (precursor de la proteína β -amiloide)

Tabla 2. Contenido de los gránulos α plaquetarios [194,208].

2.9.3- Función plaquetaria en la cicatrización tisular

El proceso de reparación tisular consta de una compleja cascada de fenómenos biológicos, controlada por numerosas citoquinas y factores de crecimiento que se liberan de forma cronológica y gradual en el lugar de la lesión [18]. Cuando se produce un daño tisular, las plaquetas se encargan en primera instancia de tratar de prevenir la pérdida de sangre por el inherente daño vascular asociado. Para ello las plaquetas se

adhieren y agregan en el punto lesional, creando una superficie procoagulante que estimula a la generación de trombina y formación de fibrina [11,194,264]. Además, bien es sabido que las plaquetas juegan un papel fundamental en los procesos de reparación y regeneración tisular, remodelación vascular, así como sobre la modulación de la inflamación y la respuesta inmunitaria [11,194,259]. Una vez se produce la activación plaquetaria, estas células sanguíneas se encargan de liberar el arsenal molecular biológicamente activo alojado en el interior de sus gránulos citoplasmáticos, de manera que promueven el reclutamiento, multiplicación y morfogénesis de diversas líneas celulares. Estas sustancias son liberadas o presentadas en la superficie de las plaquetas una vez se produce su activación, así como pueden presentarse unidas a una malla o red de fibrina que se produce una vez tiene lugar la cascada de coagulación. Como consecuencia, todo el conjunto de citoquinas y factores de crecimiento crean un gradiente quimiotáctico en el lugar de la lesión [18]. La mayoría de los factores de crecimiento mencionados anteriormente, son almacenados en los gránulos α citoplasmáticos. Tras la activación celular mediada por calcio, se induce la formación de vesículas secretoras que por exóstosis liberará al exterior el contenido de dichos gránulos citoplasmáticos [207].

Entre los factores de crecimiento esenciales para que se produzca la reparación tisular se describen: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β 1), Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF), Factor de crecimiento derivado de los hepatocitos (HGF), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), y Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) [11,208]. A continuación se describe brevemente la función que desempeña cada uno de ellos en la cicatrización de los tejidos:

2.9.3.1- *Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)*

Se trata de un potente factor de crecimiento en diversas células constituyentes del tejido conectivo, llegando a ser sintetizado además por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células gliales [141]. Este factor de crecimiento tiene la capacidad de unirse a diversas proteínas plasmáticas y de la matriz extracelular, de forma que facilita su elevada concentración local en el tejido dañado, siendo uno de los primeros factores de crecimiento detectables en el foco de lesión tras un daño tisular [79,106]. Se conoce que tras unirse a su receptor específico, presenta un potente poder

quimiotáctico, y promueve la proliferación celular, así como la síntesis de colágeno, hialuronato y proteoglicanos, como componentes de la MEC [66,106]. Además, el PDGF modula importantes procesos relacionados con la remodelación tisular, tales como la endocitosis o la migración celular [141].

2.9.3.2- *Factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1)*

Se trata de un factor de crecimiento que actúa como regulador de importantes funciones biológicas, tales como la proliferación, migración y el metabolismo celular. Dependiendo de su concentración, del tipo celular al que está expuesto, y del ambiente tisular en el que se encuentra, este péptido puede tanto estimular como inhibir la diferenciación y proliferación celular [141]. Además se considera inductor de síntesis de proteínas que componen la matriz extracelular, así como produce un estímulo de la proliferación de fibroblastos [129,243]. El TGF- β 1 se describe como un potente inductor de fibrogénesis en diversos tejidos, como riñón, pulmón, piel y músculo [36,155]. Por otra parte, esta proteína plaquetaria parece jugar un papel importante en la modulación de los fenómenos inflamatorios en el tejido muscular tras producirse un daño [238]. El TGF- β 1 también regula las acciones de otros factores de crecimiento alojados en los gránulos α plaquetarios, influenciando de forma sinérgica o antagonista con los mismos [141].

2.9.3.3- *Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF)*

Se trata de una proteína que tras su unión a los receptores específicos, induce la síntesis de enzimas colagenasa y gelatinasa. Estas enzimas contribuyen a romper la membrana basal vascular al inicio del proceso de angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos [106,200,222,246]. Este estímulo parece estar asociado a la inducción de migración y mitosis de las células endoteliales que componen los vasos sanguíneos en formación. Además, participa en la regulación de la creación del propio lumen del vaso sanguíneo, así como las fenestraciones que se describen en el árbol vascular de forma fisiológica. Se sabe que el VEGF posee un efecto quimiotáctico sobre los macrófagos y granulocitos, así como un efecto vasodilatador mediado por la liberación de óxido nítrico, con aumento de la permeabilidad vascular [79,187]. Aunque el VEGF desempeña su función principal durante las fases precoces de migración y proliferación celular, su efecto neoangiogénico supone un evento crucial durante las fases más tardías de cicatrización de tejidos músculo-esqueléticos [189].

2.9.3.4- *Factor de crecimiento derivado de los hepatocitos (HGF)*

Es uno de los factores de crecimiento mayoritarios en su liberación tras la activación plaquetaria. Su nombre proviene de su función estrechamente relacionada en la regulación de la regeneración y proliferación de los hepatocitos, así como en la proliferación de fibroblastos [98,193]. Se trata de un péptido que posee por una parte un intenso efecto angiogénico, fundamentalmente asociado a la inducción de la síntesis de VEGF, y por otra, es capaz de inducir la multiplicación de las células endoteliales y producir un efecto quimiotáctico para promover la migración celular [12]. Además, estudios experimentales han puesto de manifiesto el papel que el HGF desempeña sobre la modulación de fenómenos inflamatorios en los primeros estadios tras producirse un daño tisular [273]. Este factor de crecimiento produce una disminución de la producción de prostaglandina E₂ a través de la inhibición de la enzima ciclooxygenasa (COX) [273]. Además, su efecto anti-inflamatorio se explica a partir de su efecto inhibidor del NF-κB [28].

2.9.3.5- *Factor de crecimiento epidérmico (EGF)*

Su efecto radica fundamentalmente sobre la magnificación de la división celular, dando lugar a un incremento en la producción proteica de los diferentes componentes durante la regeneración tisular. A nivel celular se potencia la multiplicación de fibroblastos y células endoteliales que formarán los nuevos vasos sanguíneos, promueve la migración celular hacia el foco del daño, así como el crecimiento y diferenciación de queratinocitos [141,158]. Además, el EGF desempeña un papel importante durante la fase inflamatoria de la reparación del tejido músculo-esquelético tras una lesión. Se sabe que tiene lugar su expresión por parte de las células inflamatorias, con el objetivo de producir los efectos beneficiosos mencionados con anterioridad [253].

2.9.3.6- *Factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1)*

Pertenece a un conjunto de proteínas cuyas funciones radican en promover la replicación celular, síntesis de glucógeno, proteínas y glicosaminoglicanos, así como el transporte de glucosa y aminoácidos a través de la membrana celular [141]. A nivel de sistema músculo-esquelético, es donde se encuentra el principal territorio de acción de este factor de crecimiento. En este ámbito, estimula el crecimiento esquelético manteniendo la masa ósea mediante el incremento en la formación de hueso y cartílago, así como el descenso en la degradación de la MEC [46,90]. Por otro lado, el IGF-1 presenta un elevado poder quimiotáctico sobre las células endoteliales de los vasos

sanguíneos. De este modo, se produce una vez más un estímulo de neoangiogénesis en el área de reparación del tejido [29]. Se ha descrito, además de una aceleración en la recuperación funcional, un efecto anti-inflamatorio del IGF-1 aplicado de forma experimental en una rotura de tendón de Aquiles en ratas [147].

2.9.3.7- *Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)*

Se describe como una proteína con una importante actividad mitogénica, quimiotáctica y angiogénica sobre diferentes estirpes celulares [141]. Sus propiedades angiogénicas lo hacen de vital importancia durante los procesos de neovascularización en las diferentes etapas de la cicatrización tisular [158]. El bFGF está además implicado en la síntesis de colágeno de la MEC [52,106].

2.10- Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)

El PRP es un producto biológico derivado de la sangre, que tras someterla a un proceso de centrifugación, se obtiene una fracción plasmática que contiene una concentración plaquetaria superior a la determinada en sangre circulante [176,209]. Las plaquetas que se alojan en el plasma son activadas, para que de esta forma se liberen en el foco del tejido dañado los factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas, que juegan un papel fundamental en la reparación tisular [10,40,175].

El término PRP se considera una definición ambigua e imprecisa, ya que engloba de una forma general a una multitud de preparados autólogos, obtenidos a partir de diferentes metodologías, y consecuentemente con una composición muy variable cuando se comparan unos con otros [15,262]. Como cualquier otro producto utilizado en el tratamiento de una determinada patología en el ámbito de la medicina, la composición del medicamento utilizado, así como su forma de liberación, pueden afectar de forma significativa al efecto clínico que produce, y por lo tanto, ser determinante en su eficacia terapéutica [15]. Aún a día de hoy, existe una gran controversia sobre la terminología utilizada para denominar a los numerosos productos ricos en plaquetas que se citan en la bibliografía [16,19]. La falta de precisión en la definición de PRP, ha dado lugar a la aparición en la comunidad científica de numerosos productos, que a pesar de tener composiciones muy diferentes, se reconocen como una misma terapia, y que por lo tanto, pueden dar lugar a malentendidos en el juicio de su eficacia terapéutica [16,19]. En este sentido, hay que tener en cuenta que las variables: concentración plaquetaria, anticoagulante empleado, el activador plaquetario, el número de centrifugaciones y velocidad de centrifugación, y presencia o ausencia de leucocitos, son aspectos que pueden influir considerablemente en el efecto biológico de la terapia [16,215]. El efecto clínico del tratamiento no sólo depende de sus propiedades y de la metodología utilizada para su obtención, sino también es fundamental tener en consideración al paciente en el que se aplica, cuándo, cómo y dónde [16-17].

El PRGF se define como un tipo particular de PRP autólogo, dónde se considera a las plaquetas como una fuente de factores de crecimiento y multitud de proteínas biológicamente activas, que se almacenan principalmente en los gránulos α citoplasmáticos [10]. La metodología de obtención del PRGF es mediante el sistema PRGF-Endoret[®] (BTI, Vitoria, España). Se trata de un producto de fácil preparación,

que se obtiene mediante una técnica altamente reproducible, y en un corto período de tiempo [10]. El PRGF se obtiene a partir de la sangre del propio paciente, de manera que al ser autólogo, la posibilidad de que se produzca una reacción inmunológica es teóricamente nula [15]. El anticoagulante utilizado para la colección de sangre del propio paciente es el citrato sódico al 3,8% [11]. Además, el PRGF no incluye leucocitos en su composición, de manera que se evita el efecto pro-inflamatorio que pudiera provocar en los tejidos a partir de las enzimas proteasas e hidrolasas ácidas que se alojan en el interior de las células blancas, y que pueden ser perjudiciales en la reparación de ciertos tejidos [15,47,202,251]. A nivel experimental, la inclusión de la estirpe celular leucocitaria en el PRGF, se ha asociado con un incremento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, y una alteración en la liberación de los factores de crecimiento que son cruciales en el proceso de regeneración tisular [21,23].

La porción plasmática que se considera PRGF es la que se corresponde con los 0,5 ml de plasma localizados adyacentes a la porción celular sanguínea, tras la centrifugación, sin incluir ni glóbulos rojos ni leucocitos [11]. La concentración plaquetaria obtenida en el PRGF es moderada, suponiendo cuantitativamente entre 2 y 3 veces superior a la que se describe en sangre circulante del propio paciente [14,220]. De esta forma, al ajustar la concentración plaquetaria en el PRGF, permite que el producto en su totalidad presente un equilibrio adecuado entre los factores de crecimiento que se alojan en el citoplasma plaquetario, y aquellas proteínas biológicamente activas que se localizan en el plasma [15,168]. Este aspecto supone una gran ventaja con respecto a otros tipos de PRP, ya que se ha comprobado que una concentración excesiva de plaquetas puede no sólo no provocar un efecto beneficioso sobre la regeneración tisular, sino que además se pueden observar efectos deletéreos [41,88-89,215]. El efecto inhibitor sobre la reparación tisular parece ser dependiente del volumen de sangre inicial utilizada para obtener el PRP, y del volumen de PRP inoculado en el punto lesional. En definitiva, la metodología utilizada para la obtención de PRP, será determinante en el éxito clínico de la terapia [215].

El activador plaquetario utilizado es el CaCl_2 , con el objetivo de reproducir el fenómeno fisiológico de conversión de fibrinógeno a fibrina, para crear un coágulo en el lugar de la lesión, y simultáneamente producir la degranulación plaquetaria [10]. El PRGF se activa con CaCl_2 al 10% en una proporción de 0,05 ml por cada ml de PRGF [21]. Tras su activación, se produce una liberación inicial del 70% de los factores de

crecimiento de las plaquetas entre las 12 y 72 horas aproximadamente, dependiendo del factor considerado. El otro 30% queda retenido en el coágulo de fibrina que se formó inicialmente, de manera que se produce una liberación gradual durante un período superior a una semana [21,76]. Este hallazgo es muy interesante y fundamental para tenerlo en cuenta a la hora de decidir la pauta terapéutica utilizada en cada tipo de lesión.

En la metodología utilizada para la aplicación de otros tipos de PRP, se emplea la trombina bovina [97]. Se ha registrado un elevado riesgo de formación de anticuerpos frente a la trombina, y los factores de coagulación V y XI, pudiendo provocar una coagulopatía en el paciente y el consecuente riesgo de muerte [271]. Otros autores manifiestan la falta de necesidad de activación plaquetaria para que se produzca su degranulación, ya que se produciría por su simple exposición al colágeno tipo I, presente en la mayoría de territorios orgánicos [99]. Además, una posible hipótesis que refuerza la ausencia de necesidad de activador plaquetario externo, es que se podría disminuir el riesgo de aparición de efectos secundarios asociados [148]. Por el contrario, el control de la liberación de la dosis terapéutica de factores de crecimiento se produce de manera más precisa con la adición de un activador plaquetario como es el CaCl_2 , considerado como de alta seguridad, y que es utilizado para activar las plaquetas contenidas en el PRGF. Hasta la actualidad, no se registran ningún tipo de complicaciones asociadas a su uso [21,76].

2.11- Empleo de PRP en rotura aguda de tendón

Durante la primera década del siglo XXI, y hasta la actualidad, se han desarrollado multitud de métodos y técnicas de obtención y aplicación de PRP para acelerar y mejorar la reparación tisular, especialmente en tejidos con una dificultad añadida para que se culmine de forma exitosa su cicatrización, como es el caso del tejido tendinoso [6,219]. Se han realizado numerosos estudios para tratar de averiguar por un lado a nivel experimental, el mecanismo de acción de esta terapia biológica sobre la cicatrización tendinosa, y por otro, su efectividad clínica real en el tratamiento de una rotura aguda de tendón [6,13,115]. Para llevar a cabo la revisión bibliográfica de los diferentes trabajos realizados, clasificaremos el presente apartado de la tesis doctoral en: estudios experimentales (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*), y estudios clínicos.

2.11.1- Estudios experimentales del uso de PRP en una rotura aguda de tendón

2.11.1.1- Estudios in vitro

Distinguiremos entre estudios llevados a cabo *in vitro* sobre las células que de forma natural conforman el tendón, fundamentalmente tenocitos y fibroblastos, y aquellos que se realizan sobre un tejido tendinoso que mantiene la totalidad de componentes del mismo, y que se denominan como estudios *ex vivo*.

Anitua et al. [12] llevaron a cabo el primer estudio *in vitro* con el uso de PRGF sobre tenocitos. Para ello fue necesaria la extracción de una biopsia de tendón sano del músculo semitendinoso, a pacientes que se sometían a una cirugía para la reconstrucción del ligamento cruzado anterior. Tras el aislamiento, siembra e incubación, se obtuvieron poblaciones de tenocitos y fibroblastos. Posteriormente, se añadió PRGF al medio de cultivo celular. Como resultado del estudio sobre el efecto del PRGF en estas poblaciones celulares, se observó que: el PRGF produjo un aumento en la proliferación celular, así como un incremento significativamente superior en la síntesis de los factores de crecimiento VEGF y HGF [12].

En esta misma línea, el grupo de trabajo de Anitua et al. observaron que en los tenocitos cultivados con la adición de PRGF, se producía no sólo un aumento en la síntesis de los factores de crecimiento VEGF y HGF por parte de los tenocitos, sino que

además incrementaba de forma significativa la síntesis de colágeno tipo I, propio de la composición molecular natural de un tendón sano [14].

De Mos et al. [61] obtuvo biopsias de tendón en niños sanos que se sometían a una cirugía para reparar contracturas de rodilla. Los tenocitos que se multiplicaron y se mantuvieron en un PRP de similares características al PRGF, con una concentración plaquetaria de 2.55 veces superior a la descrita en sangre circulante, y con ausencia de eritrocitos y leucocitos, aumentaron de forma significativa la producción de ambos colágeno tipo I y III, que son los componentes fundamentales de la MEC del tendón sano. Al igual que en los estudios mencionados anteriormente, la adición de PRP en el medio de cultivo produjo un aumento en la síntesis de factores de crecimiento endógenos por parte de los tenocitos [61].

Para tratar de seguir investigando en el efecto del PRP sobre el metabolismo de los tenocitos, Anitua et al. [17] aislaron tenocitos de tendones sanos, y añadieron al medio de cultivo dos tipos de PRP diferentes: uno de ellos con una concentración plaquetaria dos veces superior a la descrita en sangre circulante (2xPRP), y el otro, con una concentración plaquetaria cuatro veces superior (4xPRP). Al comparar su efecto biológico, obtienen que la producción del factor de crecimiento HGF por parte de los tenocitos, aumentó de forma significativa en presencia de 2xPRP. Sin embargo, no se produjo el aumento de la síntesis de este factor de crecimiento cuando las células se enfrentaban a 4xPRP [17]. Este hallazgo laboratorial puede sugerir el efecto deletéreo de una excesiva concentración de plaquetas sobre el tejido tendinoso.

Para estudiar el posible efecto quimiotáctico del PRGF sobre los tenocitos, Anitua et al. [20] valoraron la motilidad celular y su ritmo de migración, en comparación con una microambiente de ausencia de estimulación celular. El resultado obtenido fue que con la adición del arsenal molecular contenido en el PRGF, se producía un aumento significativo de la motilidad celular, o lo que podría significar en una situación *in vivo*, un mayor efecto quimiotáctico sobre esta población celular hacia dónde se localizaba el PRGF [20].

Hasta el momento, todos los estudios *in vitro* se habían realizado sobre células procedentes de tendones sanos. Ya en el año 2013, Sadoghi et al. [217] obtuvieron cultivos de fibroblastos procedentes de tendones dañados del manguito rotador del hombro, que presentaban un aspecto degenerativo, en pacientes que se sometieron a una

cirugía de reconstrucción. Para determinar la concentración óptima de plaquetas contenidas en el PRP, sobre el tejido tendinoso patológico, se utilizaron diferentes concentraciones de 1xPRP, 5xPRP y 10xPRP, las cuales contenían la misma concentración de plaquetas que en sangre circulante, cinco veces superior y diez veces superior, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que 1xPRP y 5xPRP presentan un efecto proliferativo sobre los fibroblastos con un incremento en la producción de glicosaminoglicanos. Además, estos autores describen que una excesiva concentración plaquetaria, contenida en el 10xPRP, provoca un efecto deletéreo sobre la proliferación celular, así como sobre la producción de glicosaminoglicanos propios de la MEC del tendón [217].

En cuanto a la valoración *in vitro* del efecto del PRP sobre la modulación de la inflamación en el tejido tendinoso, Zhang et al. [273] indujeron un estado inflamatorio en tenocitos cultivados, mediante la adición de IL-1 β , una citoquina proinflamatoria. Además, se determinaron los niveles de COX-1 y COX-2, antes y después de la adición de PRP. Las mismas determinaciones se realizaron también tras la adición de un anticuerpo que bloqueaba la actividad del factor de crecimiento HGF. Los resultados obtenidos mostraron que se producía una menor expresión de COX-1 y COX-2 tras la adición de PRP, y que cuando se añadía el anti-HGF, volvía a restablecerse el estado inflamatorio inducido en un principio con la adición de IL-1 β . Por lo tanto, la conclusión que se obtiene de este trabajo es que el PRP presenta un efecto anti-inflamatorio sobre el tejido tendinoso a través de la actividad de factor de crecimiento HGF [273].

Con el objetivo una vez más de tratar de determinar la concentración óptima de plaquetas y de factores de crecimiento que produzcan los efectos beneficiosos que se persiguen sobre el tejido tendinoso, Giusti et al. [89] añadieron diferentes concentraciones de plaquetas a diferentes cultivos de tenocitos. Los resultados de este trabajo mostraron que la concentración óptima de plaquetas a la cual se produce el efecto biológico deseado de aumento de la proliferación celular, efecto quimiotáctico y aumento de la producción de colágeno, se corresponde con una concentración de entre dos y tres veces superior a la descrita en sangre circulante. Además, otro hallazgo muy importante observado en este estudio fue que concentraciones excesivamente altas de plaquetas, no sólo no producían el efecto biológico deseado, sino que además aumentaban la síntesis de metaloproteasas de la MEC, con lo cual, se produciría una

actividad proteolítica excesiva en el tejido tendinoso, afectando a la estabilidad mecánica del tendón, y por lo tanto pudiendo producir un efecto deletéreo sobre la reparación tendinosa [89].

Para estudiar el efecto de la terapia con PRP sobre las células madre derivadas del tendón, Xu et al. [267] añadieron a los respectivos cultivos celulares, PRP al 2 y 10%. La valoración de su efecto se basó en: viabilidad y proliferación celular, efectos sobre la capacidad de migración, así como la capacidad de formación de tejido tendinoso. Los resultados mostraron que el PRP aumentó la viabilidad y la capacidad de proliferación celular; aumentó el estímulo quimiotáctico y la capacidad de migración celular hacia el foco donde se ubicaba; además, el PRP estuvo asociado a un aumento de secreción de MEC para formar fibras de tejido conectivo, y a una inducción de la diferenciación celular hacia células endoteliales para formar nuevos capilares sanguíneos [267].

Por otro lado, y con el objetivo de tratar de discernir la diferencia, si la hubiera, del efecto del PRP sobre tenocitos procedentes de un tendón sano, y sobre tenocitos procedentes de tendones patológicos con aspecto degenerativo, Andia et al. [9] aislaron tenocitos del tendón del músculo semitendinoso normal por un lado, y tenocitos procedentes de tendones degenerados del manguito rotador, por otro. De forma igualitaria, se indujo un estado inflamatorio a todos los cultivos celulares mediante la adición de IL-1 β . Tras añadir a los cultivos celulares un PRP de características similares al PRGF, los resultados que obtuvieron fueron: el PRP produjo tanto en los tenocitos patológicos inflamados, como en aquellos que se había inducido la inflamación en condiciones laborales, una inmunomodulación descrita a partir de la presencia de diferentes citoquinas y sus respectivos receptores. Además, el PRP indujo un fenotipo proangiogénico en todos los cultivos celulares. Como conclusión de este trabajo, se describe que un PRP de características similares al PRGF, produjo una modulación tanto de la respuesta inflamatoria como angiogénica, de la misma forma en células procedentes de tejidos patológicos como aquellas que se extrajeron de tendones sanos [9].

2.11.1.2- Estudios *ex vivo*

Como paso intermedio entre los trabajos de investigación realizados *in vitro* e *in vivo*, se encuentran descritos estudios *ex vivo*, en los que se emplea tejido tendinoso extraído de un animal vivo, manteniendo su integridad y arquitectura tisular. En esta línea, Schnabel et al. [224] obtuvieron explantes procedentes del tendón flexor digital superficial de la especie equina. Para la valoración del efecto del PRP, con una concentración plaquetaria moderada de 3.77 veces superior a la sangre circulante, sobre la actividad metabólica del tejido, se determinaron los niveles de producción de ARN para el colágeno tipo I y tipo III. El resultado obtenido fue que tal y como se ha confirmado en estudios previos en condiciones *in vitro*, se produjo un aumento de la actividad anabólica de los tenocitos, con una mayor expresión de ARN para el colágeno tipo I y el colágeno tipo III [224].

Por último, y como trabajo de investigación en el que se confirma la importancia de la concentración plaquetaria utilizada en el PRP sobre el tejido tendinoso, Boswell et al. [41] observaron que en explantes extraídos de tendón del músculo flexor digital superficial de la especie equina, se producía una disminución del metabolismo celular, y consiguiente reducción de la producción de colágeno tipo I y colágeno tipo III, conforme aumentaba la concentración de plaquetas del PRP, hasta un máximo de 20 veces superior a la determinada en sangre circulante del propio animal [41].

2.11.1.3- Estudios *in vivo*

Para el desarrollo de este apartado, realizaremos una revisión bibliográfica de los estudios experimentales llevados a cabo sobre el efecto del PRP en una rotura quirúrgica del tendón rotuliano, y sobre la rotura del tendón de Aquiles, considerándose en ambos casos estructuras tendinosas extra-sinoviales.

a) Empleo de PRP en el tendón rotuliano

A finales de la primera década del siglo XXI, Kajikawa et al. [130] comenzaron a demostrar en un modelo animal de lesión aguda del tendón rotuliano en ratones, los efectos quimiotácticos que el PRP provocaba sobre las células progenitoras del tendón. Para ello, se realizó una lesión longitudinal bilateral en ambos tendones rotulianos, uno de ellos fue infiltrado con PRP en el momento de la cirugía, y el otro fue utilizado como control. Los animales se sacrificaron a los 3, 7, 14, 28 y 56 días tras la intervención. Los

resultados obtenidos mostraron que en estadios tempranos de cicatrización tendinosa, fundamentalmente a los 3 y 7 días tras la lesión, el tratamiento con PRP produjo un mayor efecto quimiotáctico sobre las células del sistema circulatorio que participan en la reparación tisular, con una mayor producción de colágeno tipo I y colágeno tipo III en el foco de la lesión [130].

Posteriormente, Lyras et al. [163] reprodujeron una lesión quirúrgica similar a la anterior sobre el tendón rotuliano en conejos. Para estudiar el efecto de la terapia con PRP en estadios iniciales de cicatrización, a 14 y 28 días de la cirugía, se sacrificaron los animales para llevar a cabo un estudio biomecánico e histopatológico. La terapia con PRP produjo una mejoría en las propiedades biomecánicas del tendón a los 14 días de la cirugía, con respecto al grupo control. A nivel histológico, los tendones infiltrados con PRP mostraron a los 14 días una mayor densidad celular de fibroblastos, con núcleo redondeado, indicativo de una mayor actividad metabólica. Con respecto a los vasos sanguíneos, el uso de PRP produjo una mayor densidad vascular que en los tendones del grupo control. Ya a los 28 días, ambos grupos PRP y control presentaban una cicatrización completa, con una regresión de los vasos sanguíneos. Los tendones pertenecientes al grupo PRP, presentaba una mayor síntesis de colágeno, un aspecto más fibroso, con los fibroblastos más ordenados a lo largo del eje de carga del tendón, con lo cual indicaba un mayor grado de madurez cicatricial [163].

Lyras et al. [165] en un modelo animal de lesión quirúrgica del tendón rotuliano, evaluaron la capacidad que presenta el PRP para aumentar la secreción endógena de IGF-1, como un factor de crecimiento con gran protagonismo en la reparación del tejido tendinoso lesionado. En el tendón rotuliano, se describió un aumento estadísticamente significativo del marcaje inmunológico para el IGF-1, tanto en el epitenon como en el endotenon, en comparación con el grupo control, desde la primera hasta la cuarta semana del proceso de cicatrización [165].

Tras la valoración biomecánica e histopatológica del efecto de una sola aplicación de un concentrado plaquetario sobre la reparación del tendón rotuliano en una lesión quirúrgica aguda, Spang et al. [242] observaron que a los 14 días tras la intervención, los tendones tratados con PRP no presentaban diferencias estadísticamente significativas a nivel histológico (celularidad y organización de la MEC). Desde un punto de vista biomecánico, con el objetivo de evaluar el efecto funcional de esta

terapia, los resultados muestran diferencias muy sutiles que ponen en el entredicho el efecto del PRP estudiado a los 14 días del daño en el tendón. Es de importante consideración indicar que el tipo de PRP utilizado en el experimento, contenía en la mayoría de los casos menos del doble de concentración plaquetaria, en comparación con la descrita en sangre circulante [242]. Este hallazgo experimental puede sugerir que una concentración plaquetaria inferior al doble de la concentración en sangre periférica, presenta una ausencia de efecto beneficioso de esta terapia sobre la cicatrización tendinosa.

Para tratar de valorar la composición más adecuada del PRP para estimular de forma eficiente los mecanismos de reparación tendinosa, Dragoo et al. [70] diseñaron un modelo experimental en el conejo. Para ello infiltraron el tendón rotuliano de estos animales con un PRP que contenía una concentración plaquetaria siete veces superior a la sangre circulante, y una concentración leucocitaria de diez veces superior a la sangre circulante (LR-PRP). Por otro lado, infiltraron a otro lote de animales con PRP que contenía una concentración plaquetaria aproximadamente dos veces superior a la de sangre circulante, y con prácticamente ausencia de leucocitos (LP-PRP), con lo cual este tipo de PRP sería similar al PRGF. Y por último, infiltraron el tendón rotuliano de un lote de animales con sangre completa, y otro lote con solución salina. Los animales fueron sacrificados a los 5 y 14 días de la infiltración para llevar a cabo un estudio histopatológico. Los resultados observados fueron: a los 5 días, los tendones infiltrados con LR-PRP presentaban una mayor infiltración de células inflamatorias, con una mayor respuesta vascular y con una mayor pérdida de la organización de las fibras de colágeno de la MEC. Estos hallazgos ponen de manifiesto una respuesta no deseada del tratamiento con LR-PRP en el tejido tendinoso, en comparación con el uso de LP-PRP, un PRP similar al PRGF utilizado en la presente tesis doctoral [70].

Lane et al. [150] diseñaron un modelo animal de rotura parcial aguda del tendón rotuliano en conejos. A continuación, se infiltraron de forma intralesional con PRP o con solución salina, si se trataba en este último caso de los animales pertenecientes al grupo control. Los animales fueron eutanasiados a los 7 y 28 días de la cirugía, para llevar a cabo un estudio bioquímico e histopatológico del efecto de la terapia sobre la cicatrización tendinosa. La determinación de ARN para el VEGF, IGF, PDGF-BB, bFGF, como factores de crecimiento que juegan un papel activo en el proceso de regeneración tisular, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre

ambos grupos a lo largo del estudio. Además, se determinó el nivel de expresión de ARN para el colágeno tipo I, sin detectarse diferencias significativas entre grupos en ambos tiempos estudiados. A nivel histológico, a los 7 días de la cirugía se observó una mayor densidad celular en los tendones inyectados con PRP. Al final del estudio a los 28 días se destaca una mejor organización de las fibras de colágeno en los tendones del grupo PRP. Es importante remarcar las propiedades del PRP utilizado en el presente estudio: contiene una concentración plaquetaria aproximada de 1.5 veces superior a la de sangre circulante, y un enriquecimiento leucocitario de 3 veces superior a la de sangre circulante [150]. Este hallazgo puede sugerir una vez más, que el empleo de una concentración plaquetaria en el PRP inferior al doble de la que se describe en sangre periférica, presenta una ausencia de efectos beneficiosos sobre la cicatrización tendinosa. Por otro lado, hay que tener en cuenta en este caso los efectos deletéreos que pueden traer consigo la inclusión de la capa leucocitaria en el PRP, como ya se ha descrito en el apartado 2.10 de la revisión bibliográfica en la presente tesis doctoral.

b) Empleo de PRP en el tendón de Aquiles

Ya a principios del siglo XXI, Aspenberg y Virchenko [25] evaluaron a diferentes tiempos (8, 11, 14, 21 y 28 días) el efecto de una aplicación de concentrado de plaquetas sobre la cicatrización del tendón de Aquiles tras llevar a cabo una rotura quirúrgica en ratas. Dicho efecto fue evaluado a partir del estudio biomecánico de los tendones en regeneración, y de su valoración histológica. Los resultados mostraron que el concentrado plaquetario produjo una mejora biomecánica en los tendones infiltrados con este producto. Por otro lado, a nivel histopatológico no se observaron diferencias estadísticamente significativas hasta los 21 días después de la cirugía. A partir de este momento, los tendones infiltrados con el concentrado plaquetario presentaban un callo cicatricial con un grado de madurez más avanzado, indicativo de un estadio de reparación tendinoso más avanzado que en el grupo control [25].

En esta misma línea, Virchenko y Aspenberg [257] observaron en un modelo animal similar al anteriormente descrito de rotura aguda de tendón de Aquiles, que incluso sin someter a carga de apoyo de la extremidad intervenida quirúrgicamente, el empleo de concentrado plaquetario es capaz por sí sólo de mejorar las propiedades biomecánicas del tendón a los 3 y 5 días de la cirugía [257].

Lyras et al. [164] reprodujeron un modelo animal de rotura aguda del tendón de Aquiles en el conejo. Debido a la baja vascularización que de manera natural presenta el tejido tendinoso, se considera de gran interés en este trabajo el estudio de la influencia del PRP sobre la respuesta vascular en el tendón de Aquiles tras producirse una rotura aguda. Se realizó una rotura quirúrgica del tendón de Aquiles, y a continuación, los conejos del grupo PRP fueron infiltrados con este producto, y aquellos del grupo control se infiltraron con el mismo volumen de solución salina. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos: 1, 2, 3 y 4 semanas después de la intervención. Para la valoración del estatus vascular del tejido, se realizó un marcaje inmunológico sobre la proteína CD31, que se localiza en las células del endotelio vascular [164]. Además se llevó a cabo un estudio morfométrico del núcleo de los fibroblastos y de la organización de la MEC. Los resultados histológicos fueron: a 1 y 2 semanas tras la cirugía, no se observaron diferencias significativas en ningún parámetro excepto en el número de vasos sanguíneos, describiéndose una mayor densidad vascular en los tendones del grupo PRP. Ya en la semana 3 y 4 de cicatrización, se observa una mejor orientación de los tenocitos con respecto al eje longitudinal del tendón, y un tendón completamente cicatrizado en los tendones infiltrados con PRP. Respecto a la expresión de CD31, los tendones del grupo PRP presentaron una menor densidad vascular. Este hallazgo microscópico es indicativo de una regresión vascular más acelerada con presencia de tejido cicatricial más maduro que en el grupo control [164].

Para llevar a cabo una evaluación histopatológica del efecto del PRP en una rotura aguda de tendón de Aquiles en el conejo, Geng et al. [85] realizaron una sección quirúrgica completa del tendón de Aquiles de la extremidad posterior derecha en conejos, e inmediatamente previa a su reparación se infiltró el tejido dañado con PRP. El efecto que provocó esta terapia en comparación con el grupo control fue: si bien es cierto que ambos grupos de estudio culminaron el proceso de cicatrización a las 6 semanas de la cirugía, tiempo considerado como fin de estudio, se observó que los tendones del grupo control presentaban un mayor callo fibroso que los tendones infiltrados con PRP. Por otro lado, a 1, 2 y 4 semanas de la cirugía, se observó que los tendones tratados con PRP presentaban una mayor cantidad de colágeno, y una mayor expresión de TGF- β 1, detectado a nivel de inmunohistoquímica, que los tendones del grupo control [85]. Teniendo en cuenta que dicho factor de crecimiento está directamente involucrado en la fibrogénesis de los diferentes tejidos del organismo, es

posible deducir que se está produciendo una aceleración en el proceso de reparación tendinoso desde sus primeros estadios de cicatrización [85,231].

Parafioriti et al. [198] llevaron a cabo un modelo animal de rotura aguda del tendón de Aquiles en ratas, realizando una sola infiltración de PRP en el momento de la cirugía, y dejando sin tratar a los animales que pertenecían al grupo control. Secuencialmente, se llevó a cabo un estudio histopatológico del efecto del PRP sobre la cicatrización del tendón de Aquiles a 1, 2, 4 y 6 semanas de la rotura tendinosa. La valoración histológica se basó en los criterios de: morfología del núcleo de los tenocitos, densidad celular, neovascularización, hemorragia y organización de las fibras de colágeno de la MEC. Además se llevó a cabo un estudio bioquímico e inmunohistoquímico para cuantificar la expresión de colágeno tipo I y colágeno tipo III, y de factores de crecimiento involucrados en la reparación tendinosa (PDGF y TGF- β). Los resultados obtenidos a lo largo del estudio muestran una ausencia de diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables, a ningún tiempo de análisis. Es necesario aclarar que el tipo de PRP utilizado contenía una concentración plaquetaria más de nueve veces superior a sangre circulante, y una concentración leucocitaria hasta cinco veces superior a sangre circulante [198]. Con lo cual este trabajo experimental puede ser indicativo de la ausencia de efectos beneficiosos de la terapia con PRP sobre la cicatrización tendinosa, debido a la excesiva concentración plaquetaria, y a la inclusión de la capa leucocitaria en la composición del PRP.

En un modelo animal de sección completa del tendón de Aquiles en conejos, Lyras et al. [166] evaluaron el efecto del PRP sobre la cicatrización del tendón a 1, 2, 3 y 4 semanas del daño. Los resultados encontrados fueron: el PRP produjo una mayor expresión de IGF-1 a lo largo de todo el estudio. Adicionalmente, en los tendones tratados con PRP se observó un mayor estadio de cicatrización que en el grupo control [166].

En una rotura quirúrgica aguda del tendón de Aquiles en ratas, Kaux et al. [137] llevó a cabo una valoración histopatológica, bioquímica y biomecánica, del efecto del PRP sobre la cicatrización tendinosa. Los tiempos de valoración fueron a los 5, 15 y 30 días de la rotura. Los resultados obtenidos revelaron que: a nivel histológico no existen diferencias entre ambos grupos de estudio; en cuanto a la producción de colágeno tipo I y colágeno tipo III, para el primero de ellos, no existen diferencias significativas hasta

los 30 días de estudio, observándose una mayor expresión en los tendones infiltrados con PRP. Por el contrario, no existen diferencias entre grupos de estudio en cuanto a la expresión de colágeno tipo III. Por último, a nivel biomecánico se detectaron diferencias estadísticamente significativas a los 30 días, con una mayor capacidad de estrés mecánico en los tendones inyectados con PRP que los del grupo control. Este hallazgo explicaría la mayor expresión de colágeno tipo I a este tiempo de estudio en el grupo PRP, ya que el colágeno tipo I es el más abundante en el tendón sano, y el que le aporta las propiedades biomecánicas naturales [137,240,260].

En nuestro grupo de investigación, se realizó un modelo animal de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina, un animal de mayor tamaño que en los modelos empleados en estudios previamente mencionados [76]. El procedimiento consistió en la realización de una sección completa de la estructura tendinosa, con la posterior reconstrucción quirúrgica. Los animales del grupo PRGF fueron infiltrados con PRGF activado en fase líquida, de forma intratendinosa tras la reconstrucción en quirófano. Adicionalmente, los animales recibieron de forma ecoguiada 2 infiltraciones más con PRGF inyectado intralesional, con un tiempo transcurrido de una semana entre tratamientos. Los animales fueron eutanasiados a las 4 y 8 semanas después de la rotura del tendón, con el objetivo de valorar a nivel histopatológico el efecto del PRGF sobre la cicatrización tendinosa. Las variables estudiadas fueron: parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos, densidad celular, densidad vascular, infiltrado celular inflamatorio y organización de las fibras de colágeno. Los resultados obtenidos fueron: la morfometría del núcleo de los fibroblastos fue indicativa de unos núcleos celulares más alargados y mejor orientados con respecto al eje de carga del tendón en los tendones infiltrados con PRGF, a las 8 semanas del estudio, mientras que a las 4 semanas no se mostraban diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros. Respecto a la densidad celular, los tendones infiltrados con solución salina mostraron una menor densidad celular a 4 y 8 semanas de la lesión, en los tendones tratados con PRGF. La densidad vascular observada en los tendones tratados con PRGF fue inferior a las 8 semanas de estudio, mientras que a las 4 semanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El infiltrado celular inflamatorio fue significativamente inferior en los tendones tratados con PRGF, que en los infiltrados con solución salina del grupo control. Por último, respecto al empaquetamiento y orientación de las fibras de colágeno que conforman la MEC, tanto

a las 4 como a las 8 semanas de estudio, el PRGF indujo un mejor empaquetamiento en haces de colágeno, con una mejor orientación en el eje de carga del tendón, que en los tendones del grupo control. Considerando en conjunto los diferentes hallazgos histológicos encontrados en este trabajo experimental, la conclusión fue: el empleo de PRGF en el tratamiento de una rotura completa del tendón de Aquiles se asoció a una aceleración en el proceso de reparación tendinoso, al presentar un aspecto histológico propio de un estadio de cicatrización más avanzado que los tendones infiltrados con solución salina en el grupo control [76].

Por otro lado, Allahverdi et al. [4] llevaron a cabo un estudio experimental en el que se evaluó el efecto del PRP sobre la cicatrización tendinosa en una rotura parcial del tendón de Aquiles en el conejo. Con ello se trata de asemejar la aproximación de dicha patología con tratamiento conservador a través del uso de PRP, terapia con laser a bajo nivel, o la combinación de ambas. Nos centraremos en los hallazgos descritos sobre el efecto del PRP en comparación con el grupo control. Los animales del grupo PRP fueron infiltrados en tres ocasiones, con un intervalo de una semana entre cada tratamiento, y a los 30 días de la cirugía fueron todos eutanasiados. La evaluación histopatológica se basó en la asignación de una determinada puntuación de acuerdo a una escala en la que se incluye: el grado de inflamación, la organización de las fibras de colágeno y la presencia de adherencias. Los resultados obtenidos mostraron que la terapia con PRP provocaba una mejor puntuación histológica que los tendones del grupo control. Dicho en otras palabras, la terapia con PRP estuvo asociada a la presencia de un tejido tendinoso con características propias de un estadio de cicatrización más avanzado. Además, los tendones infiltrados con PRP presentaron una mayor cantidad de hidroxiprolina, lo cual indicaba una mayor cantidad de colágeno que en los tendones del grupo control [4].

En un modelo animal de rotura aguda completa del tendón de Aquiles en ovejas, López-Nájera et al. [162] analizaron el efecto biomecánico del PRGF sobre la cicatrización tendinosa a 2, 4 y 8 semanas de la cirugía. Los hallazgos encontrados muestran que el PRGF mejoró de forma estadísticamente significativa la fuerza que es capaz de soportar el tendón de Aquiles a las 8 semanas de la cirugía, observándose un aumento progresivo de las variables estudiadas desde las 2 hasta las 8 semanas [162].

El efecto de los diferentes tipos de PRP continúa siendo muy variable y poco contundente dependiendo de múltiples variables, siendo muy importante las propiedades del PRP que se utilice como terapia adyuvante para estimular la cicatrización tendinosa. Esta variabilidad se hizo constar en el trabajo experimental llevado a cabo por Sen et al. [230], que consistió en reproducir un modelo animal de rotura aguda completa del tendón de Aquiles en el conejo. Tras la cirugía, los animales fueron infiltrados con PRP o con solución salina, en aquellos que pertenecían al grupo control. A los 28 días, todos los animales fueron eutanasiados con el objetivo de llevar a cabo un estudio histopatológico (microscopía óptica y electrónica), y un estudio biomecánico del efecto de la terapia sobre la cicatrización tendinosa. Los hallazgos registrados revelaron una ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio, indicando la ausencia de efecto del PRP utilizado sobre el proceso de reparación tendinoso. Es importante resaltar que las propiedades del PRP fueron: la concentración plaquetaria fue de 3.5 veces superior a sangre circulante, con la inclusión de la capa leucocitaria [230].

Por último, Takamura et al. [245] llevaron a cabo un modelo animal de rotura aguda completa del tendón de Aquiles, sin reconstrucción quirúrgica posterior, y realizando una infiltración con PRP. Para valorar el efecto de la terapia sobre la cicatrización tendinosa a nivel histológico, se sacrificaron los animales a 1, 2, 3, 4 y 6 semanas del tratamiento. Se llevó a cabo un estudio histoquímico con hematoxilina-eosina (HE), e inmunohistoquímico frente al colágeno tipo I de la MEC, y la proteína CD31 marcadora de células del endotelio vascular. Los resultados obtenidos fueron: el PRP produjo una morfología del núcleo de los fibroblastos más alargada; a 1 y 2 semanas, el PRP provocó un aumento en la densidad celular, mientras que a partir de 3 semanas, se asoció a una disminución de la densidad más marcada en comparación con el grupo control. En cuanto al colágeno tipo I, a partir de las 3 semanas de la cirugía se observó una mayor intensidad de tinción en los tendones infiltrados con PRP. Por último, los tendones del grupo PRP mostraron una mayor cantidad de vasos sanguíneos y de mayor diámetro, que los tendones del grupo control durante las dos primeras semanas. A partir de este momento el PRP provocó una regresión vascular más rápida que en el grupo control. Considerando los diferentes hallazgos histológicos en conjunto, el presente trabajo concluye que el PRP puede provocar un acortamiento en la fase inflamatoria de la cicatrización tendinosa, provocando de esta manera un comienzo más

temprano de la fase proliferativa, lo cual daría como resultado un estadio de cicatrización más avanzado en comparación con los tendones del grupo control [245].

2.11.2- Estudios clínicos del uso de PRP en una rotura aguda de tendón

Se registran numerosos estudios en los que se analiza el efecto clínico del uso de diversos tipos de PRP en una rotura aguda de tendón. Al igual que en el apartado anterior, se realizará una clasificación de los diferentes trabajos clínicos, dependiendo del tendón afectado (tendón rotuliano y/o tendón de Aquiles).

2.11.2.1- Empleo de PRP en el tendón rotuliano

La técnica utilizada muy frecuentemente para la reparación de la rotura del ligamento cruzado anterior en medicina humana es el autoinjerto de hueso-tendón-hueso (H-T-H), correspondiéndose la zona de tendón donante, con la porción del tercio central longitudinal del tendón rotuliano [268]. Diversos estudios en los que se lleva a cabo la evaluación mediante RM de la cicatrización del tejido donante tras la cirugía, han demostrado gran dificultad en la reparación completa, llegando a aparecer una cicatrización parcial incluso varios años después de la intervención [31,135,183]. Debido a esto, se ha empleado el PRP para estimular y mejorar la cicatrización de la zona donante del tendón rotuliano, tras producirse la rotura tendinosa quirúrgica [58,228-229].

De Almeida et al [58] realizaron un estudio clínico prospectivo en el que se compararon: un grupo de pacientes operados de rotura de ligamento cruzado craneal mediante la técnica H-T-H con implantación de un gel de PRP en la zona donante, con otro grupo de pacientes en los que se llevó a cabo la misma técnica quirúrgica pero sin el uso del gel de PRP. Para la evaluación clínica de la terapia con PRP sobre la cicatrización del tendón rotuliano, se realizó una valoración del dolor en la zona donante, así como una RM a los 6 meses de la cirugía. Los resultados obtenidos revelaron que la escala de valoración del dolor en los pacientes que se beneficiaron de la terapia con PRP fue significativamente inferior que en el grupo de estudio sin tratamiento adicional. Además, la RM reveló un área de lesión no regenerada significativamente superior en el grupo control. Esto sugiere un efecto analgésico y estimulador de la cicatrización de la terapia con PRP en una rotura quirúrgica del tendón

rotuliano para realizar la técnica de H-T-H de reparación del ligamento cruzado anterior [58].

Seijas et al. [228-229] estudiaron el efecto clínico del PRGF sobre la cicatrización del área donante en el tendón rotuliano tras la técnica H-T-H para la reparación del ligamento cruzado anterior. En uno de los trabajos realizaron valoraciones seriadas con RM a los 4, 6 y 12 meses tras la cirugía. Los resultados obtenidos revelaron un mayor porcentaje de tejido regenerado y de mayor madurez cicatricial en los tendones tratados con PRGF, en comparación con el grupo control [228]. El mismo grupo de investigación realizó además un estudio clínico del efecto de la terapia con PRGF, en el mismo escenario a través de la valoración ecográfica de la cicatrización tendinosa a las 4, 8, 16, 24, 36 y 48 semanas de la cirugía. Los resultados obtenidos revelaron que el PRGF se asocia a la producción de un tejido de mayor madurez cicatricial hasta los 4 meses de la lesión provocada en el tendón rotuliano. A partir de este momento no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. Esto indicaba una aceleración en el proceso de reparación cicatricial, ya que el tejido de aspecto ecográfico normal se ha obtenido en un menor período de tiempo, en comparación con el grupo control [229].

2.11.2.2- Empleo de PRP en el tendón de Aquiles

Con el objetivo de acelerar y mejorar el proceso de reparación tendinoso, ya en el año 2007, Sánchez et al. [218] registraron una evaluación clínica del efecto del PRGF aplicado como una terapia adyuvante en la reparación quirúrgica de una rotura aguda de tendón de Aquiles. Para ello compararon a dos grupos de pacientes: uno que habían sido tratados con una infiltración líquida de PRGF en los muñones del tendón roto reparado quirúrgicamente, junto con la sutura de una malla de PRGF adherida a la zona de reparación, con otro grupo de pacientes con un registro retrospectivo de tratamiento quirúrgico de una rotura del tendón de Aquiles, pero sin recibir terapia adicional con PRGF. El seguimiento de la reparación tendinosa estuvo basado en: la evaluación ecográfica periódica, el grosor del tendón reparado, rango de movilidad, complicaciones de la herida y la capacidad del paciente para correr a un ritmo suave. Los resultados mostraron que los pacientes tratados con PRGF recuperaron antes el rango de movilidad, el grosor del tendón reparado fue menor que en el grupo control, no mostraron complicaciones asociadas a la herida, y el tiempo necesario para que el

paciente pudiera correr a un ritmo suave fue significativamente inferior al de los pacientes del grupo control [218].

En este sentido, Filardo et al. [78] registraron el efecto de la terapia con PRP en un caso clínico de rotura parcial del tendón de Aquiles con una aproximación de tratamiento conservador. Se trataba de un deportista profesional dónde se realizaron 3 infiltraciones de PRP con un intervalo de tiempo de una semana entre cada tratamiento. El paciente fue capaz de volver a competir como jugador de baloncesto durante 20 minutos a los 64 días después de la lesión, y a los 75 días el individuo estaba capacitado para jugar un partido completo. El último registro realizado a los 18 meses después de la lesión, el paciente no ha vuelto a tener lesiones recidivantes, y mantiene el nivel de actividad competitivo normal de la temporada [78].

Guelfi et al. [92] publicaron un caso clínico de rotura traumática bilateral de ambos tendones de Aquiles, tratados quirúrgicamente y con una aplicación de PRP como terapia adyuvante. La valoración clínica fue muy satisfactoria tanto a nivel funcional como ecográfico (a 1, 3, 6 y 12 meses). El paciente fue capaz de realizar un apoyo parcial a las 4 semanas de la cirugía, y a las 8 semanas un apoyo total sin ayuda de muletas, con una mejoría progresiva hasta el final del registro a los 12 meses de la lesión [92].

En un estudio prospectivo, Zou et al. [274] realizaron un seguimiento clínico de un conjunto de casos de rotura completa del tendón de Aquiles, de los cuales un grupo de pacientes habían recibido una infiltración de PRP en el momento de la cirugía, mientras que el otro grupo no recibió ninguna terapia adyuvante. El seguimiento funcional de los pacientes (a las 3 semanas, 3, 6, 12 y 24 meses después de la cirugía) se basó en la presencia de dolor, rigidez, debilidad muscular, capacidad para calzarse, percepción subjetiva de la persona tratada, rango de movilidad y fuerza del tobillo, y las complicaciones asociadas. Los resultados mostraron que el uso de PRP como terapia adyuvante en el tratamiento de una rotura aguda completa del tendón de Aquiles, provocó una mejoría estadísticamente significativa hasta los 3 meses de seguimiento en las variables estudiadas. A partir de los 3 meses, no se registran diferencias significativas en los parámetros estudiados. Esto puede sugerir un efecto beneficioso a corto y medio plazo del uso de PRP en la rotura del tendón de Aquiles, de manera que

se produce una aceleración del proceso de regeneración tisular, con una pronta vuelta a la actividad diaria que el paciente tenía previo a la lesión [274].

Los efectos beneficiosos que se describen en los estudios previos sobre el empleo de PRP en una rotura de tendón de Aquiles, se ponen en entredicho con los resultados que detallaremos a continuación. Schepull et al. [223] llevaron a cabo un estudio aleatorio en el que todos los pacientes presentaban una rotura de tendón de Aquiles, con una resolución por tratamiento quirúrgico. Un grupo de personas fueron tratadas de forma intra-operatoria con una inyección de PRP en fase líquida en la lesión, y el otro grupo no recibió ninguna terapia adicional a la cirugía. Todos ellos fueron incluidos en el mismo plan de rehabilitación durante el post-operatorio. Para valorar la eficacia de la terapia, se realizó un seguimiento de la mecánica del tendón, valoración funcional de movimiento, y la asignación de una puntuación diseñada para valorar la evolución de la rotura del tendón de Aquiles. Los resultados revelaron no sólo que no existían diferencias estadísticamente significativas en las variables anteriormente mencionadas, sino que la puntuación de la evolución de la rotura del tendón de Aquiles en el grupo tratado con PRP fue inferior que la del grupo control, lo cual indicaba un efecto perjudicial de la terapia sobre la cicatrización tendinosa. Es de crucial importancia remarcar que el PRP utilizado contenía una concentración plaquetaria de 10 veces superior a la de la sangre circulante [223].

Por otro lado, Kaniki et al. [131] publicaron un estudio de casos clínicos que presentaban una rotura parcial del tendón de Aquiles y el tratamiento elegido fue conservador. Un grupo de pacientes fueron incluidos en el estudio para ser infiltrados con PRP en dos ocasiones, con un intervalo de dos semanas de diferencia entre los tratamientos. Los resultados se compararon con los datos registrados de forma retrospectiva en pacientes en los que no se había utilizado la terapia con PRP, considerándose en este caso como grupo control. La metodología de infiltración de PRP fue no guiada por la imagen, es decir, el punto de inyección se localizaba por palpación del hueco supuestamente creado tras producirse la rotura. Se realizó una valoración funcional periódica estudiando las variables detalladas en estudios anteriores (fuerza y elevación del talón etc.). Los resultados obtenidos muestran que el efecto del PRP sobre la cicatrización tendinosa no provocó una mejoría clínica en el tratamiento conservador de una rotura parcial del tendón de Aquiles [131].

Por último, de Carli et al. [59] desarrollaron un estudio prospectivo en el cual tras producirse una rotura completa con reparación quirúrgica del tendón de Aquiles, un grupo de pacientes fueron infiltrados con PRP sin activar en fase líquida, y la colocación de un gel de PRP en la zona reparada del tendón, y el resto de pacientes no recibieron terapia adicional (grupo control). Además, los pacientes del grupo PRP, recibieron una segunda infiltración líquida de PRP sin activar a los 14 días de la cirugía. La evaluación clínica se basó en: presencia de complicaciones, grado de engrosamiento del tendón, presencia de dolor, adherencias y capacidad funcional del individuo andando. Los resultados muestran una ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. El PRP utilizado en el grupo de pacientes correspondiente, contenía una concentración plaquetaria de 5 veces superior a la sangre circulante, con presencia de glóbulos blancos [59].

Ante la gran variabilidad de resultados obtenidos, tanto a nivel clínico como experimental, del uso de PRP para el tratamiento de una rotura aguda de tendón extra-sinovial, la comunidad científica se ve obligada a seguir trabajando para tratar de elucidar el efecto real del PRP sobre la cicatrización tendinosa tras producirse una rotura aguda, así como la metodología de obtención y aplicación más adecuada para el manejo de este tipo de lesiones.

2.12- Empleo de PRP en rotura muscular de grado II

Debido a la alta incidencia de aparición en las lesiones musculares, fundamentalmente ligadas al mundo del deporte, nace la idea del uso de factores de crecimiento y PRP, con el doble objetivo de acelerar y mejorar el ritmo de reparación y cicatrización muscular tras producirse un daño [136,185,219]. Se encuentran registrados en la bibliografía numerosos estudios que tratan de elucidar el efecto tanto a nivel experimental como clínico, que esta terapia biológica tiene sobre el proceso de cicatrización del músculo esquelético [7,190,220]. Para llevar a cabo la revisión de los diferentes trabajos realizados, clasificaremos el presente apartado de la tesis doctoral en: estudios experimentales (*in vitro* e *in vivo*), y estudios clínicos.

2.12.1- Estudios experimentales del uso de PRP en una rotura muscular de grado II

2.12.1.1- Estudios *in vitro*

En lo referente a los trabajos experimentales *in vitro*, son aquellos que se han llevado a cabo sobre las poblaciones celulares que constituyen el tejido muscular, fundamentalmente miocitos y células progenitoras de músculo.

Mazzocca et al. [178] evaluaron el efecto de diferentes tipos de PRP sobre la proliferación de miocitos. El PRP que presenta unas características similares en su composición al PRGF, sin la inclusión de leucocitos, y con una concentración plaquetaria unas 2 veces superior a la que se describe en sangre circulante, fue el único tipo de PRP que produjo un incremento en la intensidad de proliferación de los miocitos. Por el contrario, la inclusión de leucocitos, así como una concentración plaquetaria mayor con respecto a la sangre circulante del propio, no dio lugar a los efectos deseados sobre las líneas de cultivos celulares [178].

Por otro lado, en diversos experimentos laboratoriales se ha estudiado el efecto del PRP sobre mioblastos y células progenitoras de músculo [138,151,179]. McClure et al. [179] observaron que la adición de PRP al cultivo celular provocaba un aumento en la proliferación celular, así como una mayor activación de las células satélite. La activación de estas células progenitoras fue determinada por la intensidad de expresión de MyoD y Myog. Los resultados del estudio revelaron que la adición de PRP aumentaba de forma significativa la expresión de estos FRM, y por lo tanto, su

activación para la posterior multiplicación y diferenciación para formar nuevo tejido muscular [179].

De forma más genérica, Li et al. [151] estudiaron el efecto de la adición de PRP a cultivos de células progenitoras derivadas de músculo humano, incluyendo células mioendoteliales y pericitos. Los hallazgos laborales revelaron que el PRP aumentaba la proliferación celular, fundamentalmente mediado por el factor de crecimiento PDGF. Además, el PRP mantenía la pluripotencialidad de las células progenitoras, de forma que son capaces de diferenciarse tras su inoculación en un modelo *in vivo* para formar músculo esquelético [151].

Por otro lado, Kelc et al. [138] estudiaron el efecto del PRP sobre la viabilidad celular, capacidad de proliferación y diferenciación miogénica, en mioblastos humanos. Sorprendentemente, el PRP provocó un aumento en la actividad mitocondrial, y una mayor viabilidad celular. Al igual que en estudios previos, el PRP presentaba la capacidad de aumentar la proliferación celular hasta 5 veces más que sin su presencia. Respecto a los FRM, el PRP produjo un incremento en la expresión de MyoD y Myog, además de una disminución en la proporción de las células quiescentes o en reposo. Esto es indicativo de que hay un aumento del estímulo de activación y diferenciación de las células progenitoras. Por otro lado, el PRP produjo una disminución significativa en la expresión de la Mstn y del TGF- β 1, con lo cual indicaba una disminución del estímulo de formación de tejido fibroso mediado por ambos factores, y un mayor estímulo de regeneración muscular mediado por la inhibición de la expresión de Mstn [138].

2.12.1.2- Estudios *in vivo*

Entre los diferentes modelos animales de daño muscular que se registran en la bibliografía, se han llevado a cabo mediante una contusión, distensión o una laceración muscular quirúrgica. Es importante recordar que el proceso de reparación muscular tiene lugar en todas sus fases de la misma forma, independientemente de la causa que ha provocado la rotura de fibras musculares [109].

Hammond et al. [96] utilizaron PRP para el tratamiento de una lesión muscular por distensión en ratas. En particular, los autores realizaron varias infiltraciones de PRP:

en el momento de la lesión, y a los 3, 5 y 7 días después, dependiendo del momento de estudio en cada grupo de animales. Se llevó a cabo una valoración funcional y de regeneración muscular a los 3, 7, 14 y 21 días de la lesión. A partir de 7 días, los músculos tratados con PRP presentaron una mayor función contráctil. Además, el uso de PRP produjo un aumento en el porcentaje de FNC, lo cual indicaba una mayor regeneración muscular. Por otro lado, el nivel de expresión de MyoD y Miogenina determinado por RT-PCR, fue significativamente superior en los músculos tratados con PRP en comparación con el grupo control, fundamentalmente a los 7 días de la lesión, no siendo así en tiempos posteriores [96].

Gigante et al. [87] reprodujeron quirúrgicamente un daño muscular bilateral en el músculo longísimo del dorso en ratas. Una de las lesiones se trató con una malla de PRP, y la lesión contralateral se dejó sin tratar como control. Los animales se sacrificaron a 5, 10, 40 y 60 días de la intervención, para llevar a cabo un estudio histológico (regeneración muscular, vascularización, fibrosis e inflamación) del efecto de la terapia con PRP sobre la cicatrización muscular. Los resultados mostraron que el PRP dio lugar a un incremento en la regeneración muscular y en la vascularización del tejido. La determinación de la expresión de MyoD y Myog mediante inmunohistoquímica, mostró una ausencia de células positivas para estos marcadores moleculares a partir de una semana de estudio, lo cual indicaba que son factores de regeneración muscular de expresión más temprana [87].

Terada et al. [247] reprodujeron un modelo animal de contusión en el músculo tibial anterior en ratones. A continuación, los autores evaluaron no sólo el efecto del PRP sobre la reparación muscular, sino también la combinación de PRP con un agente anti-fibrótico. Tras el sacrificio de los animales a las 2 y 4 semanas de la lesión, los autores describieron a nivel histológico que el PRP por sí sólo aumentaba de forma significativa el porcentaje de FNC, en comparación con el grupo control. Por otro lado, el PRP disminuyó el porcentaje de área de fibrosis en el músculo regenerado a las 4 semanas de la contusión, en comparación con el grupo control, aunque su combinación con el agente anti-fibrótico, hizo que disminuyera aún más el área de cicatriz fibrótica a las 4 semanas de estudio [247].

En un modelo animal de laceración quirúrgica del músculo flexor de la pata en ratas, Borrione et al. [39] describieron que el PRP provocaba a nivel histológico un

mayor infiltrado celular inflamatorio previo a una semana de la lesión. Además, el tratamiento con PRP no produjo cambios remarcables a nivel del diámetro y densidad de los vasos sanguíneos. Por el contrario, esta terapia dio lugar a una mayor expresión de MyoD sólo a los 2 y 5 días de la lesión, y no posteriormente a 1 semana de estudio [39]. Estos hallazgos indicaban una vez más que la activación a nivel bioquímico de los FRM tienen lugar en un estadio muy inicial de reparación muscular.

Por otro lado, Cunha et al. [51] realizaron un estudio del efecto del PRP sobre la cantidad de fibrosis observada tras una lesión quirúrgica en el músculo cuádriceps de un modelo animal en ratas. Los animales recibieron una sola aplicación de PRP que contenía una concentración plaquetaria de 4-5 veces la descrita en sangre circulante. A las 3 semanas de la cirugía, los individuos fueron eutanasiados para realizar un estudio histológico dónde se determinaba tanto la cantidad de fibras de colágeno del tejido de reparación, como el colágeno tipo I y colágeno tipo III. Cuando se comparó el grupo PRP que no se sometía a ejercicio físico, con el grupo control sin tratar, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, los animales que se sometieron a ejercicio junto con la terapia con PRP, presentaban una menor cantidad de cicatriz fibrótica con una menor cantidad de colágeno tipo I [51]. En este trabajo se demuestra la importancia de no mantener al individuo en reposo absoluto en el manejo de una rotura muscular.

Delos et al. [63] provocaron una contusión en el músculo tibial craneal de ratas. Para estudiar el efecto de la terapia con PRP sobre la regeneración muscular, realizaron 3 infiltraciones: en el momento de la contusión, 1 y 3 días después de la lesión. Se realizó un estudio histológico sobre el nivel de regeneración muscular a partir del porcentaje de FNC, y la cuantificación de fibrosis del tejido a los 15 días de la lesión. Además, se estudio el grado de inflamación de ambos grupos de estudio a través de la cantidad de macrófagos en el tejido. Los resultados mostraron que tanto en el grado de regeneración muscular, fibrosis, así como en la intensidad de la inflamación, el PRP utilizado no produjo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Es importante destacar la composición del PRP utilizado: concentración plaquetaria al menos 4 veces superior, en combinación con una concentración leucocitaria de 4 veces superior, ambos referidos a la sangre circulante del individuo [63].

Hasta el momento, no se había determinado el efecto de la terapia con PRP sobre la regeneración muscular en un estadio de reparación precoz tras producirse una rotura. Por ello, Dimauro et al. [67] realizaron una laceración quirúrgica sobre el músculo flexor de la pata en ratas, y a continuación, un grupo de animales fue tratado con una malla de PRP, y el otro se dejó sin tratar como grupo control. Los animales se sacrificaron a los 2 y 5 días de la lesión. Se realizó la determinación de la cantidad de ARNm de la MyoD1, Myf5 y Myog, para determinar la intensidad del estímulo de regeneración muscular a nivel molecular. Los resultados mostraron que a los 2 días de la lesión, el PRP provocaba un aumento significativo en la expresión de MyoD1, y sin embargo a los 5 días ya no se observaron diferencias entre grupos de estudio. Respecto al Myf5, el PRP provocó un aumento significativo en el nivel de expresión a los 5 días de estudio, no siendo así a los 2 días. Por último, en lo referido a la Miogenina, el PRP no produjo diferencias significativas en este factor de regulación miogénico ni a los 2 ni a los 5 días de la lesión [67].

Tras llevar a cabo un modelo de contusión bilateral en ambos músculos gastrocnemio en ratas, Quarteiro et al. [204] realizaron una infiltración no ciega de la extremidad derecha con PRP, y de la izquierda con el mismo volumen de solución salina. Los animales se sacrificaron a los 7 y 21 días de la intervención, con el objetivo de valorar el efecto de la terapia a nivel histológico. Los resultados revelaron que a los 7 días, el grupo tratado con PRP presentaba una menor cantidad de colágeno que aquellos infiltrados con solución salina. Por otro lado, el grupo de músculos tratados con PRP mostraron una mayor intensidad de infiltrado celular inflamatorio que los del grupo salino, mientras que a los 21 días, los músculos no presentaban ninguna de las variables histológicas estudiadas sobre la respuesta vascular y el grado de inflamación del tejido muscular. Es imprescindible destacar que, a pesar de que los autores no detallan sobre la composición del PRP más allá de su concentración plaquetaria (4-5 veces superior a sangre circulante), el aspecto macroscópico del mismo es rojizo, según se muestra en una figura del trabajo experimental publicado. Esto indicaría la presencia de hemoglobina o eritrocitos en su composición, y en una alta probabilidad, la presencia de leucocitos [204].

Denapoli et al [65] trataron de averiguar el momento adecuado para inyectar una sola dosis de PRP tras producirse una contusión muscular. Para ello, reprodujeron un modelo de contusión en el músculo tibial anterior en ratas. Un grupo de animales fue

infiltrado al día siguiente de la contusión, otro a los 4 días, y otro a los 7 días. Todos los individuos fueron eutanasiados a los 30 días de la lesión, para llevar a cabo un estudio histológico basado en: el análisis de las FNC, indicativo de regeneración; grado de inflamación; y degeneración tisular por acúmulo de adipocitos. Los resultados mostraron que el momento óptimo de tratamiento con PRP tras producirse una contusión muscular fue a los 7 días de la lesión. En este momento se observó una mayor regeneración muscular, con una menor inflamación, así como un menor porcentaje de área de fibrosis [65].

Ante la importancia del papel que desempeña el TGF- β 1, factor de crecimiento descrito en la composición del PRP, en el desarrollo de la fibrosis muscular tras producirse un daño, Li et al [152] llevaron a cabo un estudio experimental en ratas. En primer lugar, se reprodujo una lesión muscular mediante la inyección intramuscular de una toxina. A las 24h, se infiltró de forma intralesional con una sola dosis de PRP, PBS, o PRP en combinación con un anticuerpo neutralizante del TGF- β 1, dependiendo del grupo al que perteneciera cada individuo. Los animales se sacrificaron a los 7 y 14 días de la intervención. Se realizó un estudio histológico para determinar la cantidad de fibrosis que infiltraba el tejido neoformado. Los resultados mostrados en el grupo de animales que sólo fueron infiltrados con PRP, indicaban una mayor cantidad de fibrosis que el grupo control a 1 semana, y sin diferencias respecto a la misma variable a las 2 semanas de estudio. Por el contrario, la adición de un anticuerpo neutralizante del TGF- β 1, provocó una disminución estadísticamente significativa en comparación tanto con el grupo control como con el grupo PRP sólo. Es incuestionable la importancia de detallar la composición del PRP utilizado en este trabajo. Esta consiste en una concentración plaquetaria y leucocitaria de 6 y 4 veces superior a la sangre circulante, respectivamente. Esto indica por una parte, la importancia de una elevada concentración plaquetaria en la producción de fibrosis en el músculo en reparación, y por otra, el papel crucial que juega el TGF- β 1 en el desarrollo de este tipo de cicatrización muscular patológica [152].

Ante la contradicción del uso de PRP durante las primeras horas tras producirse un daño muscular, Martins et al. [174] llevaron a cabo un estudio en el que reprodujeron una contusión muscular en ratas, y posteriormente a las 2 horas realizaron la primera infiltración con PRP o solución salina, dependiendo del grupo de estudio. Se llevaron a cabo infiltraciones sucesivas cada 48 horas, hasta el final del estudio. Los individuos se

eutanasiaron a 1, 3, 5 y 7 días después de la lesión, para llevar a cabo un estudio del nivel oxidativo, y de las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo celular. Los resultados mostraron que el uso de PRP se vinculó con una disminución de los marcadores de daño oxidativo, una mejoría en la viabilidad celular post-traumática, y un aumento de los niveles de enzimas antioxidantes. De esta manera, los autores sugieren que el PRP desempeña un papel importante sobre la modulación del daño tisular en la primera fase del proceso de cicatrización muscular, a través del metabolismo mitocondrial, y de una mejoría del sistema antioxidante endógeno [174].

Desde un punto de vista funcional, y considerando la aplicación clínica directa de la ecografía como método de diagnóstico y seguimiento de una lesión muscular, Pinheiro et al. [201] evaluaron el efecto del PRP a nivel funcional y ecográfico, en un modelo animal de laceración quirúrgica del músculo gastrocnemio en ratas. El seguimiento de la eficacia de la terapia se llevó a cabo a los 7, 14, 21 y 28 días tras producirse el daño. Los resultados mostraron que: a nivel funcional, los animales del grupo control que no se beneficiaron de la terapia con PRP mostraron una hipertrofia de la extremidad contralateral, con aumento del grosor de la musculatura, debido a una disminución del uso de la extremidad dañada. Por el contrario, el grupo de animales tratados con PRP no mostraban esta modificación estructural en la extremidad no afectada. Además, el empleo de PRP provocaba una mejoría en el aspecto ecográfico, en comparación con el grupo control, desde un estadio inicial estudiado. Los autores defienden la vital importancia de los resultados obtenidos en este trabajo experimental, y consecuentemente, la firme propuesta del uso de PRP en una lesión muscular de grado II en un escenario clínico real [201].

2.12.2- Estudios clínicos del uso de PRP en lesiones musculares de grado II

Existe una gran controversia en el uso de PRP para el tratamiento de lesiones musculares de grado II [95]. Desde principio del siglo XXI, y hasta la actualidad, se han propuesto diversas metodologías y protocolos de aplicación de PRP en este tipo de lesiones en un escenario clínico [32,94,190,212,220].

El grupo de trabajo de Sánchez et al. [221] publicaron en una comunicación al 2º Congreso mundial de medicina regenerativa, una serie de casos clínicos de rotura muscular de grado II en los que se utilizó PRGF. Se realizaron de 1 a 3 aplicaciones

intralesionales, dependiendo del tamaño de la lesión. Los resultados clínicos revelaron que desde un punto de vista funcional, la aplicación de PRGF produjo una disminución significativa en el dolor y la inflamación de la zona afectada. La recuperación del nivel de actividad del paciente se obtuvo en la mitad del intervalo de tiempo esperado. A nivel ecográfico, los músculos tratados con PRGF se mostraron completamente regenerados, sin presencia de una cicatriz fibrosa significativa. Además, no se registraron lesiones recidivantes en los pacientes que se beneficiaron de esta terapia autóloga [221].

Referido al empleo de PRGF en lesiones musculares, Loo et al. [161] emplearon 3 infiltraciones seriadas, aplicadas de forma ecoguiada, con un intervalo de tiempo de 1 semana entre tratamientos, en una rotura del músculo aductor largo. La evolución clínica del paciente fue muy favorable, con desaparición del dolor, ausencia de efectos secundarios o signos de anafilaxia, y con una vuelta al ejercicio tan sólo 1 semana después del último tratamiento [161].

El método de aplicación del PRP intralesional de forma ecoguiada en el músculo dañado, fue utilizado por Bubnov et al. [44]. Los autores del mencionado estudio clínico siguen un protocolo de actuación de una sola aplicación de PRP, llevando a cabo un seguimiento clínico de la evolución a 1, 7, 14, 21 y 28 días después del tratamiento. La comparación de los pacientes que se beneficiaron de la terapia con PRP, se realizó con deportistas profesionales que habían recibido una terapia convencional para el tratamiento de una rotura muscular de grado II. Los resultados mostraron que la escala de valoración del dolor obtenida en el grupo PRP, fue significativamente menor que en el grupo control a día 1, 7, 14 y 21. A los días 7 y 14 después del tratamiento, los pacientes del grupo PRP presentaban una mayor fuerza y rango de movilidad que los que recibieron una terapia convencional. Además, los deportistas del grupo PRP produjeron una regeneración muscular más rápida, con la consiguiente vuelta a la actividad deportiva más temprana, que aquellos del grupo control. Estos resultados sugieren un beneficio clínico de la terapia con PRP de forma ecoguiada, para el tratamiento de las roturas musculares de grado II [44].

Wetzel et al. [263] realizaron una terapia de rescate con PRP en el tratamiento de lesiones en el origen de la musculatura isquiotibial, en pacientes que habían recibido sin éxito la terapia tradicional. Sorprendentemente, la escala de valoración del dolor fue

significativamente inferior en los pacientes del grupo PRP. Adicionalmente, la valoración funcional en los individuos que se beneficiaron de la terapia con PRP, fueron asignados una puntuación significativamente superior, en comparación con las personas que siguieron sólo la terapia conservadora tradicional [263].

Para llevar a cabo la aplicación de PRP en una rotura muscular parcial de grado II, no sólo es importante el producto inyectado, sino también la técnica de aplicación utilizada, como así lo demuestra Bernuzzi et al. [32] con el uso de la ecografía para la aplicación del PRP de forma intralesional. Para comprobar la eficacia de la terapia, el protocolo utilizado fue de 3 aplicaciones, de forma intralesional guiado por ecografía, con un período de 7 días transcurridos entre cada tratamiento. Se registra un total de 53 atletas, a los cuales se realizó el seguimiento ecográfico de la evolución de la lesión, el grado de dolor en la zona lesionada, tiempo necesario para culminar la vuelta a la actividad física, lesiones recidivantes y las complicaciones asociadas al tratamiento. Los resultados revelaron que: el dolor desapareció completamente, todos los pacientes cicatrizaron completamente, y volvieron al nivel de actividad deportiva previo a la lesión, con la aparición de una sola recidiva, 1 año después del tratamiento. En consecuencia, los autores confirman la validez de la técnica utilizada para aplicar el PRP, así como la eficacia de la terapia en una lesión muscular de grado II [32].

En un ensayo clínico aleatorio, Hamid et al. [191] evaluaron el efecto de una dosis de PRP para el tratamiento de una lesión de grado II en la musculatura isquiotibial de atletas. Los hallazgos clínicos más destacados fueron que los pacientes infiltrados con PRP experimentaron una disminución en la sensación de dolor mayor que los atletas del grupo control. Además, el tiempo necesario para que los individuos volvieran a su actividad deportiva fue menor que en los atletas que siguieron sólo un protocolo de rehabilitación [191].

En esta misma línea, Rossi et al. [214] realizaron un ensayo clínico con 75 pacientes que acuden al hospital con una rotura muscular parcial aguda. Un grupo de individuos fue tratado con una infiltración intralesional de PRP junto con un protocolo posterior de rehabilitación, y el grupo control fue sólo tratado con rehabilitación. Sorprendentemente, los resultados mostraron que aquellos pacientes infiltrados con PRP, presentaron una disminución del dolor y una vuelta al ejercicio significativamente más temprana que aquellos del grupo control. Por el contrario, en el seguimiento clínico

durante 2 años tras producirse la lesión, no se registraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio [214].

En un trabajo publicado muy recientemente sobre una serie de casos clínicos de rotura muscular de grado II en la musculatura isquiotibial en jugadores profesionales de fútbol, se empleó el tratamiento con PRP, y el posterior seguimiento para valorar la eficacia de la terapia durante una media de 36 meses [270]. Se registró el tiempo de baja necesario para culminar la cicatrización muscular, el número de recidivas posteriores al tratamiento, y la calidad del tejido cicatricial por RM. Los resultados muestran que el número de recidivas fue de 3 de 25 lesiones tratadas. Curiosamente, 2 de los 3 individuos aceptaron un segundo tratamiento con PRP, llegando a cicatrizar completamente a los 15 y 26 días. Por el contrario, el otro futbolista que no aceptó un segundo tratamiento con PRP, necesitó 42 días para recuperarse completamente. Por otro lado, en la RM de revisión, se observó una cicatriz fibrosa mínima, desaparición completa del edema tisular, y un tejido muy similar al músculo normal [270].

En contraposición a los resultados anteriores, existen estudios comparativos a nivel clínico, que demuestran una ausencia de beneficio de la terapia con PRP empleado en el tratamiento de una rotura muscular de grado II [94,210-212].

Rettig et al [210] llevaron a cabo un estudio sobre un colectivo de futbolistas profesionales que habían sufrido una lesión muscular de grado II. Los autores emplearon una sola aplicación de forma ecoguiada, de un tipo de PRP inyectado en fase líquida sin activar, que contenía una concentración plaquetaria y leucocitaria de 9,3 y 5 veces superior a la sangre periférica, respectivamente. Todos los pacientes, tanto los que fueron infiltrados con PRP como los que no, siguieron el mismo protocolo de rehabilitación. Curiosamente, 4 de cada 5 roturas musculares de cada grupo de pacientes presentaron el daño muscular en el músculo bíceps femoral. El análisis estadístico realizado una vez finalizado el seguimiento clínico, mostró una ausencia de diferencias significativas respecto al tiempo que los deportistas necesitaron para culminar la vuelta al nivel de actividad que tenían previo a la lesión. Es por ello por lo que los autores concluyen que la terapia con PRP no presenta ningún beneficio clínico en su empleo para el tratamiento de lesiones musculares de grado II [210].

Con el empleo del mismo protocolo de obtención de PRP, y la aplicación de una sola dosis en fase líquida sin activar previamente al tratamiento de una lesión muscular

de grado II, Hamilton et al. [94] valoraron el efecto clínico de esta terapia en atletas. La eficacia del tratamiento fue determinada en base al tiempo necesario que el paciente necesitó para culminar la vuelta al ejercicio, valoración del tejido cicatrizado a través de RM, y al registro de lesiones recidivantes posteriores al tratamiento con PRP. Ambos grupos de pacientes (PRP y control) siguieron un protocolo de rehabilitación similar. Los resultados del análisis muestran una ausencia de diferencias estadísticamente significativas en las variables estudiadas con respecto al uso de la terapia con PRP. Por lo tanto, los autores defienden que el uso de PRP en lesiones musculares de grado II no promueve una aceleración y mejoría en la reparación muscular [94].

Por otro lado, Reurink et al. [211-212] utilizaron un protocolo de doble infiltración con ACP, un tipo particular de PRP que contiene una concentración plaquetaria inferior a 2 veces la que se describe en la sangre circulante del propio paciente. Ambos estudios se llevaron a cabo sobre 80 pacientes deportistas de diferente nivel, que habían sufrido una rotura muscular, y que se trataron con ACP en los 5 días posteriores a la rotura muscular, y una segunda infiltración a los 5-7 días más tarde. El grupo control fue infiltrado con solución salina. En el primero de los estudios clínicos, tanto en el tiempo necesario para la vuelta a la actividad física, como en el número de lesiones recidivantes durante los dos meses siguientes al tratamiento, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas asociadas al uso de ACP [211]. El mismo grupo de investigación realizó un seguimiento clínico hasta un año después de la lesión muscular en el mismo grupo de pacientes. Las valoraciones llevadas a cabo sobre el número de lesiones recidivantes, valoración subjetiva del paciente, así como la valoración a través de RM, no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. Consecuentemente, los autores reafirman una ausencia de beneficio clínico en el uso de ACP para el tratamiento de una rotura muscular parcial [212]. En este estudio clínico se pone de manifiesto de nuevo la importancia de una concentración plaquetaria adecuada para conseguir un efecto beneficioso sobre la cicatrización del tejido muscular, ya que al tratarse de menos del doble de la concentración plaquetaria descrita en la sangre periférica del propio paciente, puede resultar demasiado baja para provocar el estímulo deseado.

Ante la diversidad de resultados obtenidos en la valoración de la eficacia del uso de diversos tipos de PRP para el tratamiento de una rotura muscular de grado II, al igual que en el tejido tendinoso se refiere, es necesario seguir investigando sobre el efecto

real que el PRP produce sobre las diferentes fases de reparación muscular, así como la metodología de obtención y aplicación más adecuada para obtener el mejor efecto beneficioso de la terapia en el manejo de este tipo de lesiones.

III.Objetivos

Los objetivos genéricos planteados para el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron: por una parte, la evaluación del efecto que tiene la aplicación de PRGF sobre un estadio inicial de cicatrización de un daño agudo en el tendón de Aquiles, y por otra, la evaluación del efecto que tiene la aplicación de PRGF sobre la reparación de una rotura de grado II en el músculo bíceps femoral. Estos objetivos generales se desarrollaron en dos estudios experimentales diferentes, cuyos objetivos particulares fueron los siguientes:

ESTUDIO 1

- 1- Evaluación histopatológica de la morfometría del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, respuesta vascular, y de la matriz extracelular en el proceso de reparación precoz de un daño agudo en el tendón de Aquiles de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los tendones infiltrados con solución salina.
- 2- Evaluación histopatológica del grado de inflamación en el proceso de reparación precoz de un daño agudo en el tendón de Aquiles de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los tendones infiltrados con solución salina.

ESTUDIO 2

- 1- Diseño de un modelo experimental *in vivo* de rotura muscular de grado II de forma ecoguiada en el bíceps femoral de la especie ovina, que nos sirva para poder aplicar las inyecciones intralesionales de PRGF, y posteriormente evaluar su efecto sobre la reparación muscular.
- 2- Evaluación histopatológica del grado de inflamación en una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los músculos infiltrados con solución salina.
- 3- Evaluación histopatológica de la respuesta vascular en una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los músculos infiltrados con solución salina.

- 4- Evaluación histopatológica del nivel de regeneración muscular en una lesión de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los músculos infiltrados con solución salina.
- 5- Evaluación histopatológica de la cantidad de tejido fibrótico formado durante la cicatrización de una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los músculos infiltrados con solución salina.
- 6- Evaluación bioquímica del nivel de activación del proceso de regeneración muscular durante la cicatrización de una rotura de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los músculos infiltrados con solución salina.
- 7- Evaluación descriptiva de la ultraestructura muscular durante la cicatrización de una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina tras la aplicación de PRGF, y su comparación con los músculos infiltrados con solución salina.

IV. Material y Método Estudio 1

4.1- Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología de estudio

Para el desarrollo de la fase experimental del primer experimento de la presente tesis doctoral, se utilizaron 14 ovejas, que fueron divididas de forma aleatoria y al azar en dos grupos de estudio (grupo PRGF y grupo Salino). El grupo PRGF fue tratado con PRGF, y el grupo Salino fue tratado con solución salina (NaCl 0.9%®; BBraun VetCare, Barcelona, España). Cada uno de los grupos estuvo compuesto por 7 animales, y todos los animales fueron eutanasiados a las dos semanas de la cirugía.

El grupo de animales tratados con PRGF recibieron dos aplicaciones de PRGF, una de ellas intraquirúrgica, y la otra una semana después. Por otro lado, los animales del grupo Salino recibieron la misma pauta de dos aplicaciones de solución salina. Durante el período de estudio, se realizaron curas y limpieza diaria de los implantes colocados en la cirugía, además de una vigilancia del estado general de los individuos. Tras la eutanasia de los animales, se realizó una evaluación histopatológica del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles.

4.2- Animales

Para llevar a cabo el trabajo experimental se utilizaron 14 ovejas procedentes de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba. Los animales pertenecían a la raza Merina, con una edad comprendida entre 24-30 meses, nulíparas, no gestantes (confirmado mediante ecografía), y con un peso entre 50-55 kg (**Figura 8**). El estudio realizado fue supervisado y aprobado por el Comité de Bioética en Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (España).



Figura 8. Grupo de animales utilizado en el estudio.

Todos los animales fueron inspeccionados previamente por un veterinario, de forma que se confirmó que los sujetos estaban libres de enfermedad, y no presentaban ningún problema ortopédico. Previo a la cirugía, se realizó una analítica de sangre basal, donde se comprobaba que tanto los valores hematológicos como los de bioquímica sérica se encontraban dentro de los parámetros normales para la especie ovina. Se consideró un motivo de exclusión del estudio, el hecho de que no superara el examen físico, ortopédico, o se encontrara alguna alteración laboratorial en la analítica de sangre. A lo largo del estudio, los animales se alimentaron con agua (*ad libitum*), heno de alfalfa, paja y pienso concentrado dos veces al día.

4.3- Modelo experimental de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina

El procedimiento quirúrgico fue llevado a cabo siguiendo un modelo animal previamente descrito y publicado por nuestro grupo de investigación [76]. Primeramente, se les administró a los animales vía intramuscular la medicación pre-anestésica, que consistió en: xilacina 0,1 mg/kg (Xilagesic 2%® 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España) y morfina 0,3 mg/kg (Morfina 20 mg/ml, BBraun, Barcelona, España). Pasados 15 minutos, se colocó un catéter de 18G (Vasocan® 18G 50 x 2.2mm; BBraun, Barcelona, España) en la vena cefálica de una de las extremidades anteriores. Finalmente se procedió a la inducción del paciente bajo anestesia general con el uso de propofol a dosis efecto, con el objetivo de llevar a cabo una intubación endotraqueal segura, para mantener al animal bajo anestesia general con isoflurano.

La extremidad posterior derecha fue preparada asépticamente para la cirugía. Para ello, se rasuró desde proximalmente a la rodilla, hasta la articulación metatarsofalangiana. La zona distal a dicha articulación se cubrió con un guante de nitrilo, y posteriormente con una venda cohesiva. El animal fue posicionado en decúbito dorsal, la extremidad se colgó del techo y se mantuvo en suspensión extendida durante la preparación pre-quirúrgica y a lo largo de la cirugía (**Figura 9**). En primer lugar se realizó una limpieza de la piel con alcohol, y a continuación con clorhexidina (Desinclor® Solución antiséptica, Grupo AGB, Madrid, España). La extremidad fue aislada con paños de campo estériles impermeables (**Figura 9**). Tanto la preparación del

campo operatorio, como el procedimiento quirúrgico fueron realizados siguiendo los principios de la técnica aséptica.



Figura 9. Extremidad colgada del techo para su preparación aséptica (**izquierda**). Aislamiento del campo quirúrgico con paños de campo impermeables (**derecha**).

El procedimiento quirúrgico de sección completa del tendón de Aquiles, se llevó a cabo siguiendo la metodología ya descrita por Fernández-Sarmiento et al. [76]. Brevemente, se realizó un abordaje quirúrgico al tendón de Aquiles a través de una incisión sobre la piel que lo recubre lateralmente. Tras la disección del tendón, se realizó una incisión longitudinal en el peritendón, para obtener una exposición completa del tendón de Aquiles. A continuación, se marcó el punto de tenotomía situado a cinco centímetros proximalmente a su inserción en la tuberosidad del calcáneo. Previo a la sección quirúrgica, se realizó la pre-sutura del tendón, usando un patrón en triple polea (**Figura 10**). De esta manera, tras la sección del tendón, se conseguía una reconstrucción con aposición adecuada de los bordes tendinosos. El material de sutura utilizado fue un monofilamento sintético no reabsorbible (polipropileno, Premilene USP 1; BBraun Aesculap, Barcelona, España). Por último se realizó la tenotomía con una hoja de bisturí del número 22 (Scalpel Blade No. 22, BBraun Aesculap, Barcelona, España), y se llevó a cabo el anudado de la sutura configurada siguiendo el patrón en triple polea (**Figura 11**).

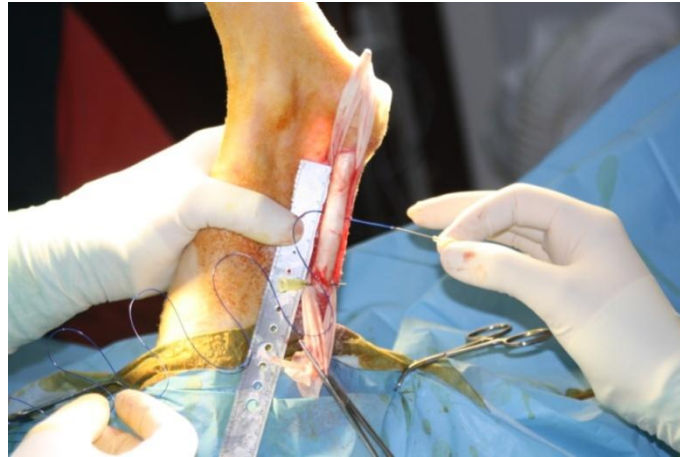
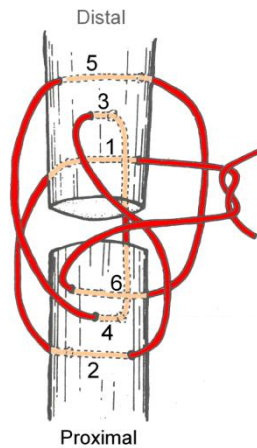


Figura 10. Esquema de la reconstrucción tendinosa siguiendo un patrón en triple polea (**izquierda**). Colocación de la sutura siguiendo el patrón en triple polea previo a la tenotomía (**derecha**)



Figura 11. Tenotomía completa del tendón de Aquiles, protegiendo la sutura (**izquierda**). Anudado de la sutura que sigue el patrón en triple polea (**derecha**).

El peritendón se suturó siguiendo un patrón simple continuo con material monofilamento sintético reabsorbible (poligliconato, Monosyn USP 3-0; BBraun Aesculap, Barcelona, España). Para finalizar, se suturó el subcutáneo y la piel de forma rutinaria, se limpió la incisión con clorhexidina, y se cubrió con un apósito estéril.

Tras suturar el peritendón, se procedió a la infiltración con PRGF o con solución salina de los bordes tendinosos recién suturados (**Figura 12**).



Figura 12. Inyección intratendinosa de PRGF o Solución salina en ambos muñones tendinosos reconstruidos tras el cierre del peritendón intraoperatorio

Tal y como se describe en el modelo animal de Fernández-Sarmiento et al. [76], y con el objetivo de proteger al tendón reparado de macro-movimientos, se colocó un fijador externo transarticular tarsal de tipo I en la cara medial de la extremidad, que se mantuvo durante todo el experimento (**Figura 13**). Por último se colocó un vendaje acolchado para proteger al fijador externo y la zona del tendón intervenida.

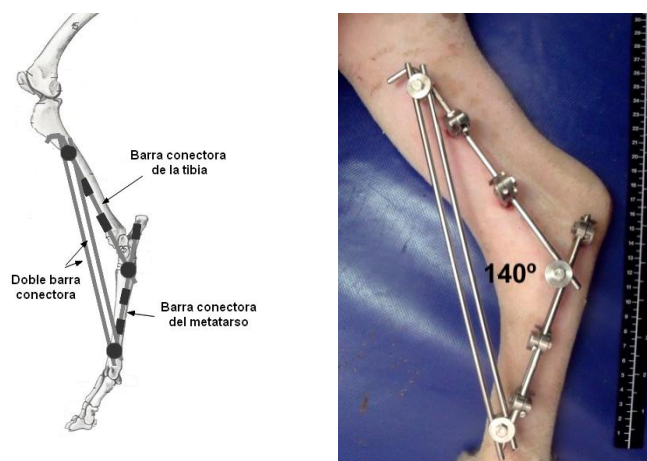


Figura 13. Esquema de la configuración del fijador externo sobre el esqueleto de la oveja (**izquierda**). Fijador externo transarticular de tipo I en el tarso colocado en la cara medial de la extremidad (**derecha**).

Como antibioterapia preventiva se utilizó benzilpenicilina con dihidroestreptomicina 15000 UI/kg y 15 mg/kg, respectivamente (Shotapen LATM; Virbac Animal Health, Barcelona, España), administrado vía intramuscular en el momento de la cirugía, y a las 72 horas. Como terapia analgésica, se administró buprenorfina 0,02 mg/kg/8h (BuprexTM 0,3 mg; Schering-Plough, Madrid, España), vía intramuscular, durante 5 días después de la intervención quirúrgica.

Es importante remarcar que no fue administrada ningún tipo de terapia anti-inflamatoria, con el objetivo de poder valorar de forma más precisa el efecto del PRGF sobre la inflamación tendinosa tras producirse un daño agudo.

Todos los animales fueron intervenidos por el mismo cirujano, para evitar la variabilidad asociada al operador. Tras la cirugía, los individuos fueron hospitalizados a lo largo del experimento, para un control post-operatorio exhaustivo, tanto del estado general de los individuos como de las heridas quirúrgicas (cambios de vendaje, limpieza y evaluación diaria).

4.4- Obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles reparado

Previo a la administración de la medicación pre-anestésica, se extrajeron cuatro tubos de sangre de la vena yugular externa de cada animal. La extracción de sangre se realizó con un sistema cerrado con aspiración por vacío (BD Vacutainer[®], Becton Dickinson Company, Madrid, España). Los tubos empleados tenían una capacidad de 5 ml, y contenían 0,5 ml de citrato de sodio (3,8%) como anticoagulante (BTI[®] Extraction Tube, BTI[®] Biotechnology Institute, Vitoria, España).

Para la obtención del PRGF, se siguió el protocolo primeramente descrito por Anitua et al. [14] para la obtención de PRGF en la especie ovina, mediante el sistema PRGF[®]-Endoret[®]. Este proceso consistió en una única centrifugación de la sangre completa, a 630G durante 8 minutos, con el uso de la centrífuga BTI Mod. PRGF System III (**Figura 14**). Como resultado, se obtiene la separación del componente celular de la sangre (eritrocitos y “*buffy coat*” o capa leucocitaria), de la fracción plasmática (**Figura 14**).



Figura 14. Centrífuga BTI® Mod. PRGF System III, programada a 630G durante 8 min (**izquierda**). Sangre centrifugada con la fracción plasmática separada de la fracción celular (**derecha**).

A continuación, se realizó un pipeteo fragmentado de la porción plasmática de la sangre. El procedimiento se llevó a cabo bajo una campana de flujo laminar (**Figura 15**). Las puntas de pipeta utilizadas habían sido previamente esterilizadas. Todo el proceso de pipeteo del plasma fue realizado siempre por el mismo investigador, de manera que se disminuye la variabilidad debido al operador.

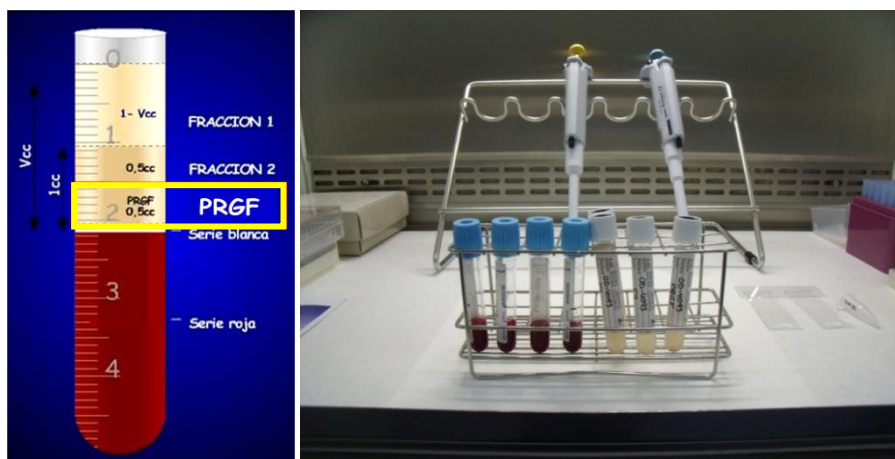


Figura 15. Esquema de las diferentes fracciones plasmáticas consideradas en la metodología de obtención del sistema PRGF®-Endoret®, con la identificación de la fracción PRGF (**izquierda**). Material utilizado para la obtención de PRGF en la campana de flujo laminar (**derecha**).

Durante el proceso de pipeteo es estrictamente necesario introducir sólo la punta de la pipeta en la superficie plasmática, e ir desplazándose hacia abajo, de forma que se evitan la formación de turbulencias que pudieran entremezclar las diferentes porciones sanguíneas. La fracción considerada PRGF, coincide con los 0.5 ml de plasma situado inmediatamente por encima de la capa leucocitaria en cada tubo de sangre centrifugada (**Figura 15**). De esta manera, se obtuvo un total de 2 ml de PRGF para su infiltración en cada animal.

Previo a su inyección de forma intratendinosa, el PRGF fue activado con el uso de cloruro de calcio (Cloruro de Calcio 10%, BBraun Medical, Barcelona, España), en una proporción de 50 µl por cada mililitro de PRGF (**Figura 16**). El proceso de activación se llevó a cabo justo antes de su aplicación intralesional en forma líquida.



Figura 16. Adición de 0.1 ml de CaCl_2 a 2 ml de PRGF previo a su inyección intraoperatorio en fase líquida

El primer tratamiento utilizado se llevó a cabo tras el cierre quirúrgico del peritendón. Con el uso de una aguja 23G (Aguja Sterican[®] 23G, BBraun Medica, Barcelona, España), se inyectó 1 ml de PRGF activado de forma intratendinosa en cada muñón reparado, en las ovejas que pertenecían al grupo PRGF. Por el contrario, aquellos animales que pertenecían del grupo Salino, fueron infiltrados con el mismo volumen mencionado, pero en este caso de solución salina y cloruro cálcico.

Una semana más tarde, y tras la preparación aséptica de la zona, se repitió el procedimiento de infiltración con PRGF o solución salina, pero en este caso de forma ecoguiada, con el animal sedado y correctamente inmovilizado (**Figura 17**). La sangre

utilizada para la obtención de PRGF se extraía previamente a la inyección del agente sedante. Para la sedación de los individuos se utilizó xilacina 0,02 mg/kg (Xilagesic 2%[®] 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España) administrada vía intravenosa.



Figura 17. Animal sedado y posicionado para recibir el tratamiento con PRGF o Solución salina intratendinoso de forma ecoguiada

4.5- Estudio histopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles

4.5.1- Eutanasia de los animales

A las dos semanas de la cirugía, todos los animales fueron eutanasiados para llevar a cabo un estudio histológico de la cicatrización tendinosa, en los grupos PRGF, Salino, así como en los tendones normales no dañados quirúrgicamente, de la extremidad posterior contralateral en cada uno de los individuos. Previamente a la eutanasia, las ovejas fueron sedadas con la administración vía intravenosa de xilacina 0,02 mg/kg (Xilagesic 2%[®] 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España). Tras asegurarse la correcta tranquilización y sedación de los animales, se procedió a la eutanasia de forma humanitaria mediante la inyección intravenosa de 15 ml de un agente eutanásico de uso veterinario (T61[™]; Intervet Schering Plough Animal Health; Salamanca, España).

4.5.2- Obtención y procesado de los tendones

Tras la eutanasia de los individuos, se extrajeron los tendones de Aquiles, tanto el tendón dañado quirúrgicamente como el tendón sano contralateral. Estos últimos fueron utilizados como un grupo control de tendón de Aquiles normal. Para la

extracción de los tendones, se realizó un corte longitudinal con bisturí sobre la zona dorsal de la piel que recubre el tendón. A continuación se disecó el subcutáneo, desde la inserción tendinosa en la tuberosidad del calcáneo hasta la unión músculo-tendinosa. El hueso calcáneo se cortó con la ayuda de una sierra ósea, y para su extracción completa, se realizó otro corte proximalmente a nivel de la unión músculo-tendinosa. Seguidamente, se retiraron los restos de sutura utilizada para reparar la tenotomía, y se dividió longitudinalmente en todo su espesor el tendón de Aquiles en dos mitades iguales, con la ayuda de un bisturí del número 22 (Scalpel Blade No. 22, BBraun Aesculap, Barcelona, España) (**Figura 18**). Por último, se realizó la fijación de los tendones mediante su inmersión en formol al 10% diluido en tampón fosfato pH 7.0 durante 48h.



Figura 18. Tendón de Aquiles normal (a) y dañado (b) tras su extracción para llevar a cabo el estudio histológico (**izquierda**). Tendón de Aquiles seccionado longitudinalmente para su posterior inclusión en formol al 10% (**derecha**).

Tras el procesado en laboratorio, se obtuvieron dos bloques de parafina de cada tendón dañado, un bloque que incluía el muñón tendinoso proximal, y otro bloque del muñón tendinoso distal. Por otro lado, del tendón sano contralateral se obtuvo un bloque de parafina.

4.5.3- Estudio histológico

De cada uno de los bloques obtenidos previamente, se extrajeron ocho láminas de tejido no consecutivas de 4 μm de grosor cada una. Cada porción seccionada fue montada en un portaobjetos para su posterior tinción: dos fueron teñidas con

Hematoxilina-Eosina (HE), dos con Tricrómico de Masson (TM), dos fueron utilizadas para el análisis inmunohistoquímico (IHQ) del colágeno tipo I, y otras dos para el análisis IHQ del colágeno tipo III.

Para estandarizar la selección de las zonas de tejido tendinoso a estudiar, y objetivizar el análisis lo máximo posible, se realizó un muestreo sistemático aleatorio mediante la superposición de una lámina de acetato punteada previamente. De esta manera, estos puntos se emplearon como referencia de las zonas donde posteriormente se tomaba una fotografía histológica en el campo microscópico localizado justo a la izquierda del punto. Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio (Carl-Zeiss® Axiophot, Carl-Zeiss® Inc., Oberkochen, Alemania), que tenía una cámara digital acoplada (Nikon® DS Camera Head DS-5M, Nikon® Corp., Tokyo, Japón) (**Figura 19**). En cada uno de los cortes histológicos teñidos con HE, se tomaron 10 imágenes histológicas a x100 aumentos, 10 a x200 aumentos, y otras 10 a x630 aumentos. Por otro lado, de cada corte histológico teñido con TM, y de los cortes obtenidos como resultado del estudio IHQ para el colágeno tipo I y colágeno tipo III, se tomaron 10 imágenes histológicas a x200 aumentos. Todas las imágenes fueron identificadas y codificadas mediante un código numérico para llevar a cabo la evaluación de una manera ciega.



Figura 19. Fotomicroscopio utilizado para realizar las capturas histológicas a diferentes magnificaciones

Las imágenes histológicas procedentes de los cortes teñidos con HE, fueron analizadas con la ayuda de un programa informático de análisis de la imagen (Image Pro Plus® versión 6.0, Media Cybernetics Inc., Bethesda MD, EEUU), previamente

utilizado en estudios histológicos similares al llevado a cabo en la presente tesis doctoral [76,164].

La valoración microscópica del proceso de cicatrización tendinoso se realizó en base a unas variables histológicas previamente utilizadas para definir de una forma precisa el grado de evolución de la reparación del tendón, y que están basadas en la respuesta fisiológica normal del tendón ante una rotura aguda [76]. Las variables histológicas utilizadas son las siguientes:

4.5.3.1- *Morfometría del núcleo de los fibroblastos*

Los parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos, que fueron evaluados sobre las imágenes histológicas tomadas a x630 aumentos, en los cortes teñidos con HE. Una vez abierta cada imagen histológica con el programa de análisis de la imagen mencionado con anterioridad, se contorneaban de forma precisa todos los núcleos de los fibroblastos de la foto con la ayuda de una tableta gráfica conectada al ordenador (Tableta gráfica Slimline Design TB-5300, Trust Spain® S.A., Madrid, España). A continuación, el programa informático nos daba los valores de los siguientes parámetros morfométricos de cada una de las siluetas trazadas: área (μm^2), perímetro (μm), eje mayor (μm), eje menor (μm), factor forma [$(\text{perímetro})^2/4 \times \text{Pi} \times \text{área}$], aspecto nuclear [*nuclear aspect ratio* (NAR)], y orientación nuclear [*nuclear orientation angle* (NOA)].

El parámetro NAR es definido como la relación existente entre el eje menor y el eje mayor del núcleo del fibroblasto (eje menor/eje mayor). Cuanto más cercano a 0 es este valor, sugiere una forma del núcleo más alargada; mientras que a medida que el valor se acerca más a 1, significa que la morfología del núcleo es más redondeada [104]. El parámetro NOA se define como el ángulo existente entre el eje mayor del núcleo del fibroblasto y el eje longitudinal del tendón. Valores cercanos a 0° indican que el núcleo está perfectamente alineado con el eje longitudinal del tendón, mientras que valores más cercanos a 90° indican que la orientación del núcleo del fibroblasto es perpendicular al eje longitudinal de carga del tendón [104].

4.5.3.2- *Densidad de fibroblastos*

La cuantificación de esta variable se realizó con el uso del programa de análisis de la imagen Image Pro Plus® versión 6.0, y con el empleo de las imágenes histológicas realizadas a x630 aumentos. La densidad de fibroblastos (fibroblastos/ mm^2) se calculó

dividiendo el número de fibroblastos contados en la imagen histológica, entre el área de la imagen capturada a una magnificación de x200 (0.142 mm²).

4.5.3.3- *Respuesta vascular*

Para la evaluación del grado de respuesta vascular se utilizaron las imágenes histológicas teñidas con HE, y tomadas a x100 aumentos. Los parámetros vasculares considerados fueron la densidad vascular y el diámetro de los capilares sanguíneos. La densidad vascular (vasos/mm²) se calculó dividiendo el número de vasos sanguíneos entre el área de la imagen capturada a una magnificación de x100 (0.559 mm²). El diámetro de los capilares (μm) fue calculado a partir de su contorno y posterior determinación mediante el programa Image Pro Plus[®] versión 6.0.

4.5.3.4- *Grado de inflamación*

El grado de inflamación fue evaluado con el uso de las imágenes histológicas teñidas con HE, y tomadas con una magnificación de x200. Para ellos se diseñó una escala de valoración semicuantitativa de 5 puntos, donde 0 se correspondía con una ausencia de infiltrado celular inflamatorio, y 4 con una inflamación severa (**Tabla 3**). El diseño de esta escala de valoración estuvo basado en la distribución e intensidad del infiltrado celular inflamatorio en el tejido, como una modificación de la escala previamente descrita por Manning et al. [171].

Grado de inflamación y descripción histológica	Valor (0-4)
<u>Severa</u> : infiltrado celular inflamatorio distribuido homogéneamente en todo el campo histológico, con presencia de agregados de células inflamatorias de mayor y menor tamaño	4
<u>Fuerte</u> : menos de 10 células inflamatorias aisladas por campo histológico, con 1-2 agregados de células inflamatorias de mayor tamaño, de distribución perivascular, con o sin presencia de 1-3 agregados de células inflamatorias de pequeño tamaño, de distribución perivascular	3
<u>Moderada</u> : menos de 10 células inflamatorias aisladas por campo histológico, con 1-3 agregados de células inflamatorias, de distribución perivascular	2
<u>Suave</u> : menos de 10 células inflamatorias por campo histológico, sin formación de agregados de células inflamatorias	1
Ausencia de células inflamatorias	0

Tabla 3. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación del grado de inflamación en el tejido tendinoso

Los datos obtenidos para las variables histológicas evaluadas sobre las imágenes de HE, fueron calculados a partir de las 40 capturas histológicas realizadas en el mismo tendón. En primer lugar, se hizo el promedio de los valores de todos los fibroblastos de una misma captura, luego el promedio de los valores de las 10 capturas de un mismo corte histológico, posteriormente de los 2 cortes histológicos de un mismo bloque, y por último el promedio de los dos bloques de un mismo tendón.

4.5.3.5- Organización de las fibras de colágeno

Para la determinación de la organización de las fibras de colágeno se utilizaron las imágenes histológicas teñidas con TM, y tomadas a una magnificación de x200. Sobre ellas se estudiaron dos parámetros que definen la mayor parte de la estructura del tendón:

- 1- El grado de compactación de las fibras de colágeno: que indica el grado de empaquetamiento de las fibras de colágeno del tendón, de manera que a mayor madurez cicatricial, se asocia a un mayor grado de compactación de estas fibras.

- 2- El grado de orientación de las fibras de colágeno: indica la disposición de las fibras de colágeno en el foco cicatricial.

La valoración de ambas variables se realizó en base a dos escalas semicuantitativas de 5 puntos (**Tabla 4 y 5**). Estas escalas han sido empleadas previamente para evaluar la cicatrización del tendón [76].

Descripción histológica	Valor (0-5)
Formación homogénea de haces de colágeno altamente empaquetados	5
Formación regular de haces de colágeno con una compactación densa	4
Formación regular de haces de colágeno con una compactación moderada	3
Formación regular de haces de colágeno con una compactación pobre	2
Presencia de sustancia fundamental amorfa	1
Ausencia de colágeno	0

Tabla 4. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación del grado de compactación de las fibras de colágeno

Descripción histológica	Valor (0-5)
Haces de colágeno paralelos al eje del tendón	5
Haces de colágeno con una angulación ligera con respecto al eje del tendón	4
Haces de colágeno con una angulación moderada con respecto al eje del tendón	3
Haces de colágeno con una angulación marcada con respecto al eje del tendón	2
Haces de colágeno sin orientación específica	1
Ausencia de colágeno	0

Tabla 5. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación de la orientación de las fibras de colágeno

4.5.3.6- *Evaluación IHQ del colágeno tipo I y colágeno tipo III*

La técnica IHQ realizada para el inmunomarcaje del colágeno tipo I y tipo III se desarrolló según los siguientes pasos:

- 1- Desparafinado e inicio de rehidratación del tejido tendinoso: inmersión en xilano durante 30 minutos, seguido de etanol absoluto durante 10 minutos.
- 2- Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena: inmersión en 3% de H₂O₂ en metanol durante 30 minutos.
- 3- Continuación de la rehidratación del tejido tendinoso: inmersión en etanol 96° durante 5 minutos, y en etanol 70° otros 5 minutos.
- 4- Desenmascaramiento antigénico: inmersión en EDTA pH 9 a 96°C durante 10 minutos.
- 5- Lavado con una solución tamponada PBS (pH 7.4 a 0.01 M)
- 6- Adición de suero normal de cabra 10% en PBS, 100 µl/preparación, e incubado durante 30 minutos en una cámara humidificada.
- 7- Adición del anticuerpo primario frente al colágeno tipo I (Rabbit anti-bovine collagen type I; Millipore; California, EEUU), y al colágeno tipo III (Rabbit anti-rat collagen type III; AbD Serotec; Kidlington, Reino Unido). Incubado durante 18 horas a 4°C en una cámara humidificada.
- 8- Adición del anticuerpo secundario biotinilado e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 9- Adición del complejo peroxidasa-avidina-biotina (Laboratorios Vector; Burlingame, California) y mantenido durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente.
- 10- Detección de reacción positiva: revelado con el cromógeno tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina.
- 11- Contra-tinción con solución de Harry's hematoxilina.

Para la evaluación del área marcada positivamente, así como de la intensidad del marcaje frente al colágeno tipo I y tipo III, se utilizó una escala de valoración semicuantitativa de 5 puntos, previamente empleada para evaluar el colágeno tipo I y III en el tendón en regeneración [50] (**Tabla 6**).

Extensión de la reacción inmunohistoquímica	(0-3)
Inexistente	0
Menos del 50% del corte histológico	1
Entre el 50-80% del corte histológico	2
Más del 80% del corte histológico	3
Intensidad de la reacción inmunohistoquímica	(0-3)
Inexistente	0
Débil	1
Moderada	2
Fuerte	3

Tabla 6. Escala de valoración semicuantitativa para la evaluación de la extensión y la intensidad de la reacción IHQ frente al colágeno tipo I y tipo III.

4.6- Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa de análisis estadístico SPSS® versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Todas las variables fueron analizadas para comprobar su distribución normal con el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos de morfometría del núcleo de los fibroblastos, la densidad de fibroblastos, y la densidad y diámetro vascular fueron expresados como media \pm desviación estándar. Las variables mencionadas fueron analizadas con una prueba t para muestras no pareadas. Por otro lado, las variables consideradas no paramétricas (grado de inflamación, empaquetamiento y orientación de las fibras de colágeno, y el estudio IHQ del colágeno tipo I y tipo III) fueron analizadas con un test U de Man-Whitney. Los resultados en este caso fueron expresados como mediana \pm rango. En todos los casos, el nivel de significación fue establecido cuando $p < 0,05$.

V. Resultados

Estudio 1

5.1- Modelo experimental de rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina

No se registraron complicaciones perioperatorias asociadas al modelo animal de rotura aguda de tendón de Aquiles en la oveja. Todos los animales completaron el período de estudio establecido (**Figura 20**).



Figura 20. Grupo de animales durante el período post-operatorio: se observa a los animales con la extremidad operada sin apoyar, y con el fijador externo localizado en la cara medial de la misma

5.2- Estudio histopatológico del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles

5.2.1- Morfometría del núcleo de los fibroblastos

Los resultados de los parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos de los tendones normales, grupos Salino y PRGF se muestran en la **Tabla 7**.

Datos morfométricos	Normal	Grupo Salino	Grupo PRGF	P
NAR	0.06 ± 0.01	0.47 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.85
NOA (°)	2.64 ± 0.90	15.50 ± 2.51	15.63 ± 4.15	0.95
Eje mayor (μm)	31.11 ± 4.16	12.83 ± 0.46	12.72 ± 0.38	0.68
Eje menor (μm)	1.93 ± 0.28	5.66 ± 0.27	5.67 ± 0.23	0.93
Factor forma	7.44 ± 0.84	1.44 ± 0.06	1.42 ± 0.04	0.60
Área (μm ²)	44.80 ± 11.92	57.18 ± 1.93	56.71 ± 2.23	0.73
Perímetro (μm)	62.35 ± 7.64	31.65 ± 0.65	31.40 ± 0.64	0.56
Densidad fibroblastos (fibroblastos/mm ²)	227.78 ± 97.81	3125.46 ± 678.90	3641.90 ± 411.50	0.18
Densidad vascular (vasos/mm ²)	0.47 ± 0.66	31.14 ± 9.68	21.63 ± 7.60	0.12
Diámetro vascular (μm)	5.50 ± 1.13	24.82 ± 2.28	25.43 ± 1.90	0.66

Tabla 7. Datos morfométricos del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, densidad y diámetro vascular en los tendones normales, grupo Salino y grupo PRGF.

El tendón de Aquiles normal mostró los núcleos celulares de los tenocitos con una morfología alargada. El valor del parámetro NAR aumentó significativamente en ambos grupos de tendones seccionados quirúrgicamente, y tratados con PRGF o con solución salina. Este valor significa que la morfología del núcleo de los fibroblastos en los tendones dañados, se mostraba más ovalada que en los tendones normales.

Los núcleos de los tenocitos del tendón normal se mostraban con una posición de su eje mayor altamente alineado y paralelo con respecto al eje longitudinal de carga. El valor del parámetro NOA mostró un incremento significativo en los tendones tratados con PRGF, y aquellos inyectados con solución salina. Consecuentemente, esto se traducía en que los núcleos de los fibroblastos no se encontraban alineados y organizados paralelamente con respecto al eje longitudinal del tendón.

Ninguno de los parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos mostraba diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo PRGF con el grupo Salino.

5.2.2- Densidad de fibroblastos

Los resultados obtenidos para la densidad de fibroblastos se muestran en la **tabla_**. Los tendones normales mostraron una densidad celular muy baja. Por el contrario, a las dos semanas de producirse el daño tendinoso, se experimentó un aumento significativo en la densidad de fibroblastos de todos los tendones seccionados, los pertenecientes al grupo Salino y aquellos del grupo PRGF. El análisis estadístico mostró una ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (**Tabla 7**).

5.2.3- Respuesta vascular

La respuesta vascular fue evaluada en base a la densidad vascular y al diámetro de los capilares sanguíneos que se describieron a nivel histológico. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 7**. Los tendones normales se caracterizaron por presentar una densidad vascular baja con capilares de pequeño diámetro. Dos semanas después de la cirugía, ambas variables mostraron un incremento significativo en todos los tendones dañados quirúrgicamente, tanto los tratados con PRGF como aquellos que

fueron infiltrados con solución salina. El estudio estadístico muestra una ausencia de diferencias significativas entre los grupos Salino y PRGF (**Tabla 7**).

5.2.4- Grado de inflamación

El estado inflamatorio de los tendones de Aquiles fue evaluado en base al infiltrado celular inflamatorio. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 8**. Los tendones normales no dañados mostraron una ausencia de infiltrado celular inflamatorio a nivel histológico. Ambos tendones tratados con PRGF y aquellos infiltrados con solución salina, experimentaron un incremento del infiltrado celular inflamatorio con respecto al tendón intacto. La principal población de células inflamatorias observadas en el infiltrado fueron linfocitos. Los tendones pertenecientes al grupo PRGF exhibieron un menor infiltrado celular inflamatorio estadísticamente significativo, en comparación con los tendones del grupo Salino. A nivel histológico, los tendones tratados con PRGF no mostraron en ninguno de los casos un infiltrado celular inflamatorio equivalente a un grado de inflamación fuerte o severo, según la escala de valoración semicuantitativa utilizada en el presente estudio (**Figura 21a & b, y Figura 22**).

Infiltrado celular inflamatorio <i>Porcentaje de individuos que reciben cada puntuación</i>	Normal	Grupo Salino	Grupo PRGF	P
Severa (4)	-	16.0%	-	
Fuerte (3)	-	28.0%	-	
Moderada (2)	-	56%	4.0%	
Suave (1)	-	-	56.0%	
Ausencia (0)	100%	-	40.0%	
Mediana \pm rango	0 \pm 0	2 \pm 1	1 \pm 0	0.004*

Tabla 8. Infiltrado celular inflamatorio de los tendones normal, grupo Salino y grupo PRGF. (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Salino y PRGF ($p < 0.05$).

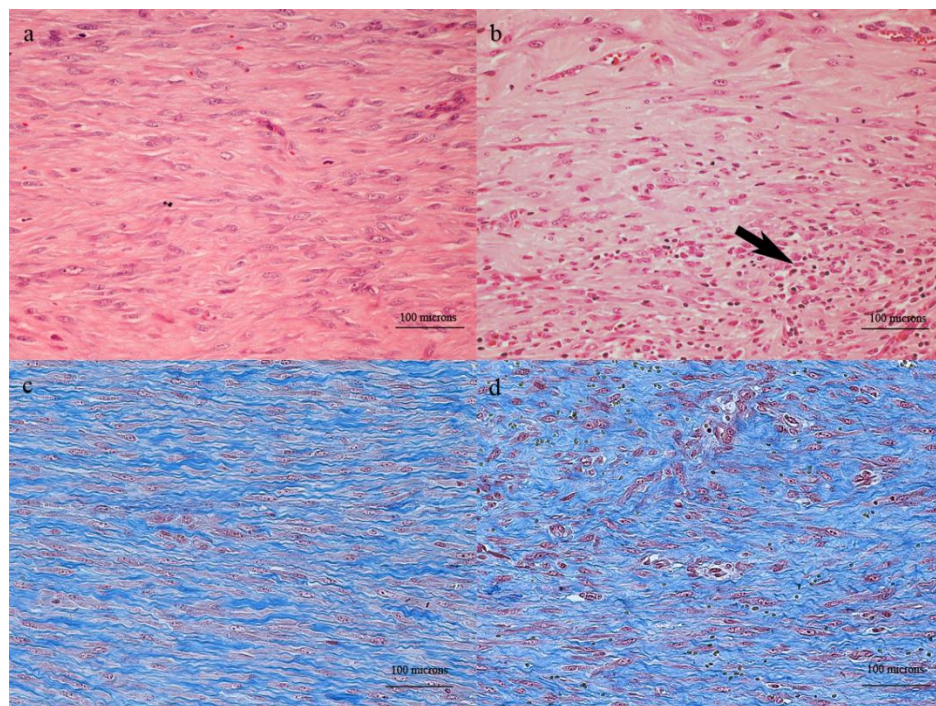


Figura 21. Imágenes histológicas representativas teñidas con HE (a & b) y TM (c & d), de los tendones de Aquiles dañados quirúrgicamente en la oveja, y tratados con PRGF (a & c) o con solución salina (b & d). El infiltrado celular inflamatorio fue significativamente mayor en el grupo Salino (**flecha**), que en el grupo PRGF.

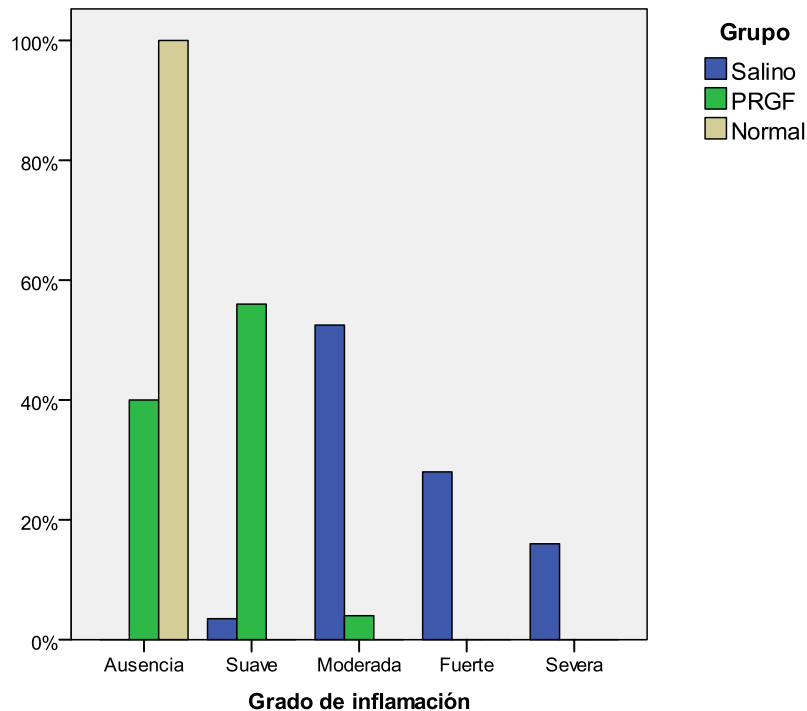


Figura 22. Distribución de frecuencias del grado de inflamación mostrado en las imágenes histológicas procedentes del grupo Salino, grupo PRGF y de los tendones normales. Los tendones tratados con PRGF no mostraron ninguna imagen histológica con una inflamación fuerte o severa

5.2.5- Organización de las fibras de colágeno

La organización de las fibras de colágeno de la MEC fue evaluada a partir del grado de empaquetamiento y orientación de dichas fibras con respecto al eje longitudinal de carga del tendón. Estos parámetros fueron valorados sobre las imágenes procedentes de los cortes histológicos teñidos con TM. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 9**. El tendón intacto no dañado se caracterizó por la presencia de haces de colágeno homogéneos, estrechamente empaquetados y paralelos al eje longitudinal del tendón. Sin embargo, a las dos semanas de la intervención quirúrgica, se observó una desorganización visible de la matriz colagénica en ambos grupos de estudio, describiéndose una disminución en los valores asignados para ambas variables de empaquetamiento y orientación de las fibras de colágeno. El análisis estadístico llevado a cabo para comparar ambos grupos PRGF y Salino, no mostró diferencias significativas para ambas variables (**Figura 21c & d**).

Empaquetamiento de las fibras de colágeno <i>Porcentaje de individuos que reciben cada puntuación</i>	Normal	Grupo Salino	Grupo PRGF	P
Grado 4	100%	-	-	
Grado 3	-	10.5%	2%	
Grado 2	-	80%	83.5%	
Grado 1	-	9.5%	14.5%	
Grado 0	-	-	-	
Mediana \pm rango	4 \pm 0	2 \pm 2	2 \pm 2	1.00
Orientación de las fibras de colágeno <i>Porcentaje de individuos que reciben cada puntuación</i>				
Grado 4	100%	-	-	
Grado 3	-	9.5%	11.5%	
Grado 2	-	63.5%	68.5%	
Grado 1	-	24.5%	19.0%	
Grado 0	-	2.5%	1.0%	
Mediana \pm rango	4 \pm 0	2 \pm 3	2 \pm 3	1.00

Tabla 9. Empaquetamiento y orientación de las fibras de colágeno en los tendones normal, grupo Salino y grupo PRGF.

5.2.6- Evaluación IHQ del colágeno tipo I y colágeno tipo III

El análisis IHQ se realizó sobre los componentes principales de la MEC del tendón en regeneración, el colágeno tipo I y el colágeno tipo III. Respecto al colágeno tipo I, se mostró una reacción positiva en ambos grupos de estudio PRGF y Salino (**Figura 23a & b**). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la extensión del área con reacción positiva, ni en lo que a la intensidad de la tinción se refiere. Por otro lado, se observó un incremento en la reacción positiva frente al colágeno tipo III tanto en los tendones tratados con PRGF como aquellos infiltrados con solución salina, en comparación con los tendones no

dañados (**Figura 23c & d**). Por el contrario, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos PRGF y Salino.

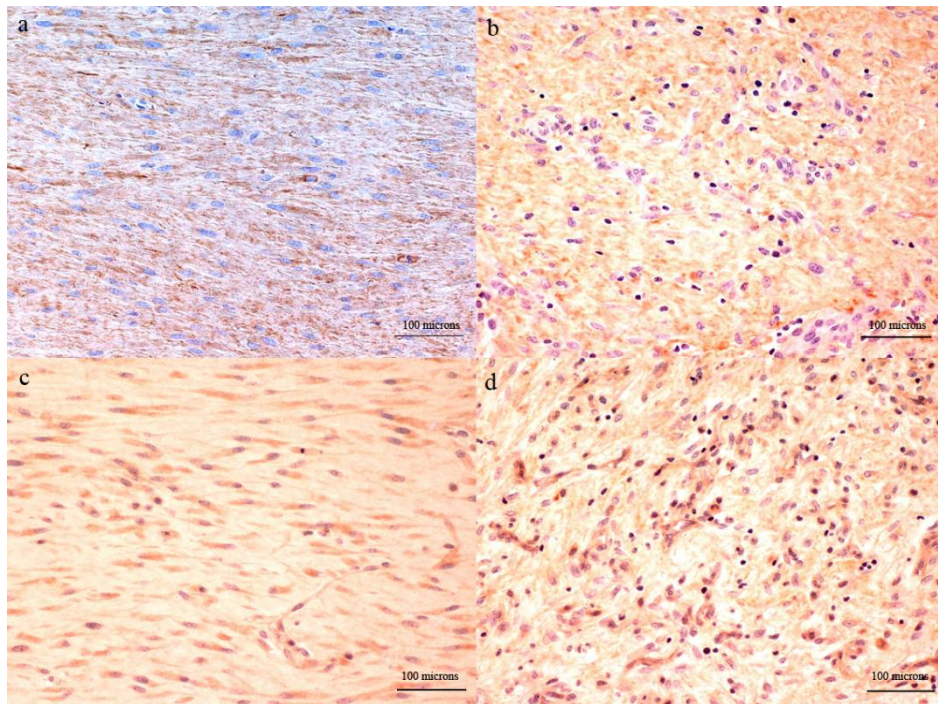


Figura 23. Imágenes histológicas representativas del estudio IHQ para el colágeno tipo I (**a & b**) y el colágeno tipo III (**c & d**), de los tendones de Aquiles dañados quirúrgicamente en la oveja, y tratados con PRGF (**a & c**) o con solución salina (**b & d**).

VI. Discusión

Estudio 1

6.1- Empleo de PRGF en una rotura aguda de tendón

La rotura aguda total o parcial del tendón de Aquiles es una tendinopatía común que se caracteriza como una lesión grave, que incapacita al paciente de forma temporal o incluso permanente para la realización de la actividad diaria, y que presenta un gran impacto social y económico en la práctica profesional del deporte [72,82].

Debido al bajo potencial de cicatrización del tejido tendinoso, se han empleado diversos tipos de PRP, con el objetivo de por un lado, acelerar el proceso de reparación tendinoso, y por otro, mejorar la calidad del tejido regenerado para evitar la aparición de lesiones recidivantes [14,26,59,76,78,137,150,162,164,218,223,229-230,242,245,274].

El PRGF, es un tipo de PRP, que ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de una lesión aguda de tendón, provocando una aceleración en la regeneración tisular, y la producción de un tejido cicatricial de mayor calidad, con características similares al tendón normal previo a la lesión [76,162,182,218,229]. Esta terapia biológica autóloga ha sido utilizada en condiciones experimentales para valorar su efecto histopatológico sobre la cicatrización del tendón de Aquiles a las 4 y 8 semanas tras reproducir quirúrgicamente una rotura aguda completa [76]. Los resultados del estudio revelaron que la terapia con PRGF provocó una mejora significativa en las características morfológicas del núcleo de los fibroblastos, en la organización de las fibras de colágeno, así como una menor densidad celular y vascular, en comparación con el grupo de animales que fueron tratados con solución salina. Estos hallazgos histológicos son indicativos de que los tendones del grupo PRGF se encontraban en un estadio de cicatrización más avanzado, que los tendones del grupo control [76].

Según lo descrito hasta la actualidad, no existe ningún estudio en el que se evalúe el efecto histopatológico del PRGF sobre la cicatrización tendinosa temprana a las 2 semanas de producirse una rotura aguda del tendón de Aquiles. Es por ello por lo que nos planteamos en nuestro grupo de investigación la realización del primer estudio de la presente tesis doctoral, como continuación al trabajo experimental llevado a cabo por Fernández-Sarmiento et al., donde se realizó la valoración del efecto del PRGF sobre la cicatrización del tendón de Aquiles a las 4 y 8 semanas de producirse una rotura completa [76].

6.2- Evaluación histopatológica del efecto del PRGF sobre un estadio temprano del proceso de cicatrización del tendón de Aquiles

Tras producirse una rotura tendinosa total o parcial, se liberan una amplia variedad de citoquinas y agentes vasoactivos en el foco de la lesión [45,235]. En el presente estudio, el tendón de Aquiles sano presentó una densidad vascular muy baja con capilares de pequeño diámetro. Por el contrario, al producirse el daño quirúrgico, se observó un incremento significativo en la densidad y diámetro de los capilares en ambos grupos PRGF y Salino, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Este fenómeno de neoformación de vasos sanguíneos tiene lugar en respuesta al estímulo angiogénico que se produce en el tejido dañado. Con lo cual, se consigue el aporte sanguíneo necesario para que se lleven a cabo los diferentes fenómenos de reparación, y la retirada de los productos del deshecho metabólico [45]. En concordancia a los resultados del presente trabajo, Fernández-Sarmiento et al. [76] en un modelo animal de rotura aguda completa del tendón de Aquiles en la especie ovina, tampoco registró diferencias en la densidad y el diámetro de los capilares entre ambos grupos de estudio, a las 4 semanas de la rotura tendinosa. Sin embargo, a las 8 semanas del daño tendinoso, estos autores describieron una menor densidad vascular y diámetro capilar en los tendones tratados con PRGF, que en aquellos del grupo control [76]. Esto puede ser indicativo de que el PRGF desencadena la formación de un tejido tendinoso con un aspecto de mayor madurez cicatricial, en comparación con el grupo Salino, y detectable de forma más tardía a las 4 semanas del proceso de cicatrización tendinosa.

Si bien es necesario que tenga lugar una respuesta inflamatoria durante el estadio inicial de reparación tendinosa, se ha demostrado que altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias, pueden resultar en un daño tisular colateral, y una alteración en el proceso de cicatrización del tendón [172]. De este modo, la modulación de la respuesta inflamatoria resultaría beneficiosa para que tenga lugar una correcta reparación tendinosa. Las plaquetas contienen en su interior gran cantidad de moléculas biológicamente activas, citoquinas y factores de crecimiento, que juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria [40,194]. En nuestro estudio experimental, el tendón de Aquiles sano presentaba una ausencia de infiltrado de células inflamatorias en el tejido. En los tendones dañados quirúrgicamente, se observó un incremento en la cantidad de células inflamatorias en ambos grupos PRGF y Salino. Sin embargo, los tendones infiltrados con PRGF mostraron un menor infiltrado celular

inflamatorio estadísticamente significativo, que aquellos que se trataron con solución salina. Estos resultados son sugerentes de un efecto anti-inflamatorio asociado a la terapia con PRGF en un estadio inicial de reparación tendinosa. En concordancia con nuestros resultados, nuestro grupo de investigación observó en un estudio previo, un menor infiltrado celular inflamatorio en los tendones tratados con PRGF a las 4 y 8 semanas tras una rotura aguda completa en el tendón de Aquiles [76]. De esta manera, se confirma el papel activo que desempeña la terapia con PRGF sobre la modulación de los fenómenos inflamatorios durante la fase temprana de reparación tendinosa. Esta modulación viene explicada por el factor de crecimiento HGF, contenido en el PRGF, y que se ha demostrado tener un papel anti-inflamatorio sobre tenocitos inflamados en condiciones *in vitro* [273].

Estudios previos han demostrado que la depleción completa de algunos tipos de células del sistema inmune y de ciertos factores pro-inflamatorios, pueden provocar un retraso en la reparación tendinosa [157]. Por ello, se describe que la importancia de conseguir una correcta modulación y equilibrio de la inflamación tisular, puede ser beneficioso para la cicatrización tendinosa [57,172]. Una posible ventaja en el uso de PRGF sobre otros tipos de PRP, es el hecho de que el PRGF no incluye en su composición la capa leucocitaria, circunstancia que ha demostrado ser causante de un estímulo pro-inflamatorio en el tejido tendinoso [70]. En esta línea, la inflamación tendinosa observada en una menor intensidad con el uso de PRGF en nuestro experimento a las 2 semanas, puede promover un acortamiento de la fase inflamatoria, con una aceleración en el proceso global de reparación, como ya se ha confirmado en un estudio histopatológico a las 4 y 8 semanas en un modelo animal similar al realizado para el primer experimento de la presente tesis doctoral [76].

Durante las primeras semanas de cicatrización tendinosa tras una rotura aguda de tendón, se produce la llegada de multitud de células de origen externo y estirpe variada, procedentes de la circulación sanguínea y de la vaina tendinosa, así como aquellas que proceden del propio epitenon y endotenon, hacia el foco dañado [192]. El efecto quimiotáctico y proliferativo sobre los fibroblastos hacia el tejido lesionado, provocan un acumulo de esta población celular, que serán los encargados de la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros componentes de la MEC [115].

En nuestro estudio experimental, se observó a nivel histológico un incremento significativo de la densidad de fibroblastos tanto en el grupo de tendones tratados con PRGF, como en aquellos inyectados con solución salina del grupo Salino, con respecto al tendón sano. Fernández-Sarmiento et al. [76] en un modelo animal similar al del presente trabajo, con la diferencia de que realizó un total de 3 infiltraciones de PRGF o solución salina, con el mismo intervalo de tiempo entre tratamientos de 1 semana, describió una menor densidad de fibroblastos en los tendones inyectados con PRGF, que en aquellos del grupo Salino, a las 4 y 8 semanas de la intervención quirúrgica [76]. Esta diferencia significativa puede estar explicada porque los tendones del grupo PRGF mostraban un estadio de cicatrización más avanzado que los del grupo Salino. De este modo, deducimos que el PRGF induce cambios detectables a nivel de densidad celular, en un tiempo más tardío de 2 semanas tras producirse una rotura aguda tendinosa.

Respecto a los parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos estudiados en nuestro modelo experimental, se produjeron cambios significativos en ambos grupos PRGF y Salino, con respecto a los tenocitos descritos en el tendón normal no dañado. El valor de NAR aumentó bruscamente en ambos grupos de estudio, con lo cual indicaba que los núcleos de los fibroblastos presentaban una morfología ovoidea, al contrario que los tenocitos del tendón normal, que se caracterizaron por presentar un aspecto fusiforme. El aspecto nuclear ovalado está asociado con un incremento en la actividad metabólica celular, con el objetivo de producir los componentes de la MEC dañada, principalmente colágeno, y de esta forma rellenar la discontinuidad creada tras la rotura del tendón [103,203,235,260]. El valor de NOA en los tenocitos del tendón sano, fue indicativo de un alineamiento del eje mayor del núcleo celular paralelo a la línea de tensión del tendón. A las 2 semanas tras producirse la rotura tendinosa quirúrgica, se apreció una desorganización del núcleo de los fibroblastos en ambos grupos PRGF y Salino. La pérdida de alineamiento del núcleo celular con respecto al eje de carga del tendón es un fenómeno que se produce durante la fase proliferativa del proceso de cicatrización tendinosa, en la cual se encuentran los tendones dañados del presente trabajo [203]. Al igual que en el presente estudio, Spang et al. [242] no registraron diferencias significativas entre el grupo PRP y el grupo Salino, en los parámetros histológicos estudiados a las dos semanas de un daño agudo en el tendón rotuliano [242]. De la misma manera, Kaux et al. [137] tampoco observaron diferencias estadísticamente significativas en la valoración semicuantitativa del proceso de

reparación del tendón de Aquiles a los 15 días de producir una rotura quirúrgica [137]. Además, en un estadio de cicatrización más avanzado tras la rotura aguda del tendón de Aquiles en la especie ovina, Fernández-Sarmiento et al. [76] describieron que a las 4 semanas, el PRGF tampoco provocaba diferencias estadísticamente significativas detectables en los parámetros NAR y NOA. Sin embargo, a las 8 semanas de la cirugía, se registraron diferencias significativas entre grupos de estudio, de forma que los tendones tratados con PRGF presentaban una morfología del núcleo de los fibroblastos más alargada y alineados con respecto al eje longitudinal de carga del tendón, que en los tendones infiltrados con solución salina [76]. Por lo tanto, estos hallazgos histológicos pueden ser indicativos de que el PRGF produce cambios en la morfometría celular, detectables en estadios posteriores a 2 y 4 semanas en el proceso de cicatrización tendinosa, que son compatibles con un tejido de mayor madurez cicatricial.

El tendón sano está estructurado de forma jerárquica, desde una molécula de colágeno, formación de fibrillas, haz de fibras y fascículos, hasta constituir el tendón en su totalidad [33,260]. El desarrollo de la función mecánica del tendón, depende del ensamblaje y organización de las fibras de colágeno altamente empaquetadas, paralelas con respecto al eje de carga del tendón [33,272]. El tendón sano está constituido fundamentalmente por colágeno (65-80% del peso seco es colágeno tipo I), junto con proteoglicanos, glicoproteínas, agua y células [260]. Transcurridos pocos días desde el inicio de la fase de remodelación de la cicatrización tendinosa, se alcanza el máximo de producción de colágeno tipo III, la cual finaliza en pocas semanas, y coincide con un aumento en la síntesis de colágeno tipo I [235]. En el presente estudio, el tendón sano estaba constituido por haces de colágeno altamente empaquetados, con las fibras de colágeno orientadas paralelas al eje longitudinal del tendón. A las 2 semanas de la rotura quirúrgica en el tendón de Aquiles, se describió una disminución en el empaquetamiento y en la orientación de las fibras de colágeno, de la misma forma en los tendones que pertenecían al grupo PRGF y al grupo Salino. En concordancia a nuestros resultados, Spang et al. [242] describieron una ausencia de efecto del tratamiento con PRP detectable a las 2 semanas sobre las fibras de colágeno de la MEC del tendón rotuliano tras producirse un daño agudo, en comparación con los tendones infiltrados con solución salina [242]. En esta misma línea, Kaux et al. [137] describieron una ausencia de efecto del PRP detectable a las 2 semanas sobre los parámetros estudiados respecto a la matriz colagénica, en un modelo animal de rotura

aguda del tendón de Aquiles en ratas [137]. Además, Fernández-Sarmiento et al. [76] reveló a las 4 y 8 semanas de una rotura aguda del tendón de Aquiles, que los tendones infiltrados con PRGF presentaban una matriz colagénica con un mayor empaquetamiento y mejor orientación de las fibras de colágeno que los tendones del grupo control [76]. Esto hace pensar que el estadio de cicatrización en el que se encuentran los tendones a las 2 semanas de la ruptura, el tejido tendinoso es demasiado inmaduro para poder percibirse cambios remarcables en la organización de las fibras de colágeno entre ambos grupos PRGF y Salino.

Como continuación del estudio de la MEC, se llevó a cabo un análisis IHQ en el que se determinaba de forma semicuantitativa la cantidad de colágeno tipo I y colágeno tipo III del tendón en regeneración. Los resultados obtenidos mostraron una ausencia de diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los tendones infiltrados con PRGF con respecto a los del grupo Salino. En esta misma línea, Kaux et al. [137] no demostraron diferencias en la cantidad de ARNm para el colágeno tipo I y tipo III a las 2 semanas de una rotura aguda de tendón de Aquiles en ratas [137]. Por el contrario, estos mismos autores detectaron una mayor expresión de ARNm para el colágeno tipo I a los 30 días de la lesión, en los tendones tratados con PRP, en comparación con los tendones del grupo Salino [137]. Por otro lado, Lane et al. [150] describieron una ausencia de efecto del PRP sobre la proporción de colágeno tipo I y tipo III a 7 y 28 días de una lesión aguda de tendón rotuliano en conejos [150]. Considerando los resultados de los diferentes trabajos experimentales referenciados previamente, la conclusión que obtenemos es: la terapia con PRGF en una rotura aguda de tendón de Aquiles, no provoca un efecto detectable sobre la expresión de colágeno tipo I y tipo III, en un estadio precoz de reparación tendinosa a las 2 semanas tras una rotura completa.

6.3- Comparación de nuestros resultados experimentales con los estudios clínicos que emplean PRP en el tratamiento de una rotura aguda de tendón

El PRGF ha sido utilizado en un escenario clínico para estimular la cicatrización tendinosa tras producirse una rotura aguda [218,228-229]. Sánchez et al. [218] registraron que el uso de PRGF como una terapia adyuvante en la reparación quirúrgica de una rotura completa del tendón de Aquiles, provocaba una mejoría clínica y funcional superior a los pacientes que no se beneficiaron de esta terapia autóloga [218]. Por otra parte, Seijas et al. [228-229] demostraron el beneficio clínico del uso del PRGF para estimular la cicatrización de la zona donante del tendón rotuliano en la técnica quirúrgica H-T-H de reparación de la rotura del ligamento cruzado anterior.

El hallazgo histopatológico más destacado en este primer estudio de la presente tesis doctoral, es el efecto anti-inflamatorio asociado a la terapia con PRGF en el modelo animal de rotura aguda completa del tendón de Aquiles en la especie ovina. La presencia de una mayor intensidad de inflamación, está asociada a un mayor grado de dolor desde un punto de vista clínico [77]. Con lo cual, este hecho supone un problema no sólo para el bienestar del paciente, sino también una dificultad añadida en la recuperación del mismo.

En este sentido, el uso de PRP en la zona donante del tendón rotuliano durante la reparación del ligamento cruzado anterior, se ha asociado a un menor grado de dolor en el postoperatorio, que en los pacientes que no recibieron esta terapia [58]. Esto puede ser debido a: el efecto anti-inflamatorio del PRP mediado por el factor de crecimiento HGF, y por la presencia de otras sustancias contenidas en el plasma, como la serotonina, dopamina y catecolaminas, que interfieren en la generación, conducción y percepción del dolor tras producirse un daño tisular [49,273].

Es necesario puntualizar que en la mayoría de los estudios clínicos sobre el uso de PRP en una rotura aguda de tendón, referenciados en la revisión bibliográfica de la presente tesis doctoral, se realizan análisis morfológicos y funcionales a tiempos más tardíos de 2 semanas. Este aspecto metodológico implica una gran dificultad para llevar a cabo la comparación de los efectos de la terapia con PRGF, con el efecto clínico de otros tipos de PRP sobre el estadio inicial de cicatrización tendinosa en una rotura aguda de tendón.

6.4- Limitaciones del estudio

Se pueden considerar dos limitaciones en el primer estudio experimental de la presente tesis doctoral:

- 1- El experimento incluye sólo el análisis de un tiempo en el proceso de cicatrización tendinosa a las 2 semanas de producirse una rotura aguda completa en el tendón de Aquiles de la especie ovina. Nuestro grupo de investigación llevó a cabo este trabajo como continuación de un experimento previo, en el cual se realizó una valoración de la terapia con PRGF sobre el mismo modelo animal de rotura tendinosa, a las 4 y 8 semanas de la cirugía. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio era intentar clarificar el efecto que produce el PRGF sobre un estadio de cicatrización tendinosa más temprano.
- 2- No se ha llevado a cabo un estudio biomecánico de los tendones dañados para determinar el efecto funcional del PRGF en un estadio de cicatrización temprano. El hecho de que no se detectaran diferencias significativas tanto con los parámetros morfométricos del núcleo de los fibroblastos, como en las propiedades de las fibras de colágeno de la MEC, fue sugestivo de que a nivel biomecánico tampoco encontraríamos diferencias entre los tendones del grupo PRGF y aquellos que pertenecían al grupo Salino.

VII. Material y Método Estudio 2

7.1- Diseño experimental: Grupos experimentales y cronología de estudio

Para el desarrollo de la fase experimental del segundo estudio de la presente tesis doctoral, se utilizaron 21 ovejas, que fueron divididas de forma aleatoria y al azar en tres lotes de 7 animales cada uno, dependiendo del tiempo de permanencia en el estudio (**T1**: 1 semana; **T2**: 2 semanas; **T4**: 4 semanas). Los animales de T1, T2 y T4 se eutanasiaron a una, dos y cuatro semanas después del inicio del estudio, respectivamente (**Figura 24**).

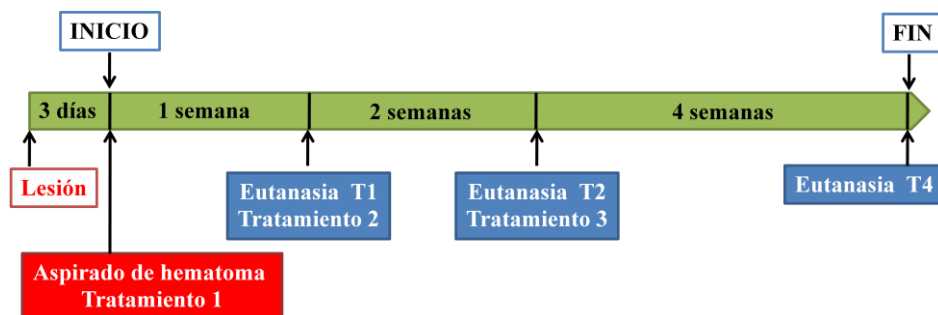


Figura 24. Representación gráfica de la cronología del estudio. **T**: tiempo de eutanasia a 1, 2 y 4 semanas de estudio. **Tratamiento**: PRGF en una extremidad y Solución salina en la extremidad contralateral

Se reprodujo de forma quirúrgica una rotura muscular equivalente a una lesión de grado II en el bíceps femoral de ambas extremidades posteriores del mismo individuo. Tres días más tarde, momento considerado como inicio de estudio, se realizó de forma ecoguiada el aspirado del hematoma que se había formado entre los muñones de las fibras musculares rotas. A continuación, se llevó a cabo la inyección intralesional de forma ecoguiada en una extremidad con PRGF, y en la extremidad contralateral con Solución salina (NaCl 0.9%®; BBraun VetCare, Barcelona, España), siendo la elección del tratamiento de nuevo de forma aleatoria y al azar.

Los animales del lote T1, recibieron una sola aplicación con PRGF y solución salina en la extremidad correspondiente al inicio del estudio. Los animales del lote T2, recibieron dos aplicaciones de PRGF y solución salina en la extremidad correspondiente, con una semana de intervalo de tiempo entre tratamientos. Y los animales del lote T4, recibieron tres aplicaciones de PRGF y Solución salina en la extremidad correspondiente, igualmente con una semana de intervalo de tiempo entre tratamientos. Durante el período de estudio se realizaron curas y limpieza diaria de las

heridas, además de una vigilancia del estado general de los individuos. A las cuatro semanas del inicio del experimento, se consideró como fin del periodo de estudio. Tras la eutanasia de los animales en los diferentes tiempos, se realizó una evaluación histopatológica y bioquímica del proceso de cicatrización del músculo bíceps femoral.

7.2- Animales

Para llevar a cabo el trabajo experimental se utilizaron 21 ovejas procedentes de la Granja Experimental de la Universidad de Córdoba. Los animales pertenecían a la raza Merina, con una edad comprendida entre 24-30 meses, nulíparas, no gestantes (confirmado mediante ecografía), y con un peso entre 50-55 kg (**Figura 25**). El estudio realizado fue supervisado y aprobado por el Comité de Bioética en Investigación Animal de la Universidad de Córdoba (España).



Figura 25. Grupo de animales utilizado en el estudio, que están siendo alimentados con heno de alfalfa (**izquierda**), y pienso concentrado (**derecha**).

Todos los animales fueron inspeccionados previamente por un veterinario, de forma que se confirmó que los individuos estaban libres de enfermedades y no presentaban ningún problema ortopédico. Al igual que en el primer estudio, se realizó una analítica de sangre basal previo a la cirugía, donde se comprobaba que los valores hematológicos y de la bioquímica sérica se encontraban dentro de los parámetros normales para la especie ovina. Se consideró un motivo de exclusión del estudio si el animal no superaba el examen físico, ortopédico, o se encontraba alguna alteración laboratorial en la analítica de sangre basal. Diariamente, los animales fueron

alimentados con heno de alfalfa, pienso concentrado dos veces al día, y agua *ad libitum* (Figura 25).

7.3- Modelo experimental de rotura muscular de grado II del bíceps femoral en la especie ovina

El objetivo a cumplimentar en el presente modelo animal, fue de llevar a cabo una laceración muscular quirúrgica, de forma ecoguiada, equivalente a una lesión de grado II en el bíceps femoral de ambas extremidades posteriores de cada oveja. La magnitud de la rotura muscular de grado II (con una pérdida de continuidad del 70% de las fibras musculares) fue confirmada de acuerdo a una escala de clasificación de las lesiones musculares propuesta por MS et al. [190], en la que se emplea la ecografía como herramienta diagnóstica (Tabla 10).

Grado	Descripción ecográfica
0	Sin alteración ecográfica
1	Sólo edema muscular
2a	Rotura parcial de fibras musculares, afectando al <33% de las fibras
2b	Rotura parcial de fibras musculares, afectando al $\geq 33 - 66\%$ de las fibras
2c	Rotura parcial de fibras musculares, afectando al $\geq 66 - 99\%$ de las fibras
3	Rotura completa del músculo

Tabla 10. Clasificación de una rotura muscular con el uso de la ecografía como herramienta diagnóstica

Los animales fueron sedados mediante la administración intramuscular de xilacina 0.1 mg/kg (Xilagesic 2%[®] 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España) y morfina 0.3 mg/kg (Morfina 20 mg/ml, BBraun, Barcelona, España). Pasados 15 minutos, se colocó un catéter de 18G (Vasocan[®] 18G 50 x 2.2 mm; BBraun, Barcelona, España) en la vena cefálica de una de las extremidades anteriores. A continuación, se procedió a la inducción del paciente bajo anestesia general con el uso de propofol a dosis-efecto, con el objetivo de llevar a cabo una intubación endotraqueal suave y segura, para mantener al animal bajo anestesia general con isofluorano. Durante el

procedimiento, los animales fueron monitorizados para los parámetros cardiovasculares, respiratorios, analgésicos y de profundidad anestésica (**Figura 26**).



Figura 26. Animal mantenido bajo anestesia general intubado vía endotraqueal (**izquierda**). Monitorización avanzada del animal durante la cirugía (**derecha**).

El animal fue posicionado primeramente en decúbito lateral izquierdo, para realizar la lesión en el músculo bíceps femoral de la extremidad posterior derecha. Posteriormente, el animal fue colocado en decúbito lateral derecho, para repetir el mismo procedimiento quirúrgico en la extremidad posterior izquierda. Para asegurar que la extremidad intervenida adoptara una posición horizontal y paralela a la superficie de la mesa, se introdujo una toalla entre ambas extremidades posteriores (**Figura 27**). La cara lateral de ambos muslos fue preparada de forma aséptica para la cirugía. Para ello, se rasuró desde el íleon hasta la mitad de la pierna distalmente, y toda la superficie lateral desde la cara anterior hasta la cara posterior del muslo, rodilla y pierna. En primer lugar, se realizó una limpieza de la piel con alcohol 96°, y a continuación, con clorhexidina (Desinclor[®] Solución antiséptica, Grupo AGB, Madrid, España).



Figura 27. Animal posicionado en decúbito lateral izquierdo con la extremidad posterior derecha preparada asépticamente, y colocada paralela a la mesa.

La cara lateral del muslo fue delimitada y aislada con paños de campo impermeables (**Figura 28**). Tanto la preparación del campo operatorio, como el procedimiento quirúrgico fueron realizados siguiendo los principios de la técnica aséptica.

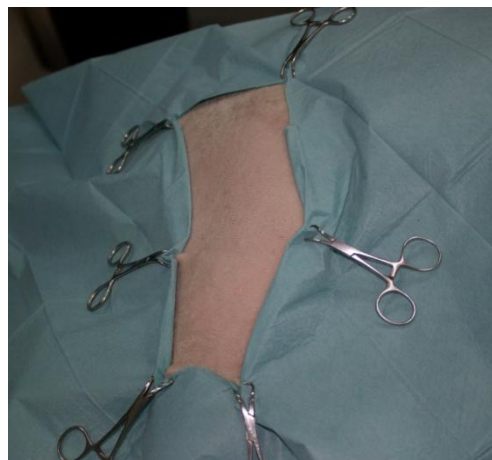


Figura 28. Delimitación del campo quirúrgico con paños de campo impermeables estériles.

Se marcaron las referencias anatómicas del trocánter mayor y el cóndilo lateral del fémur con un rotulador quirúrgico. A continuación, se marcó el punto medio diafisario, y por último, se consideró el punto situado a mitad de distancia entre el punto medio diafisario y el trocánter mayor del fémur, como la localización anatómica exacta y precisa donde se realizaría la rotura muscular de grado II sobre el bíceps femoral (**Figura 29**).

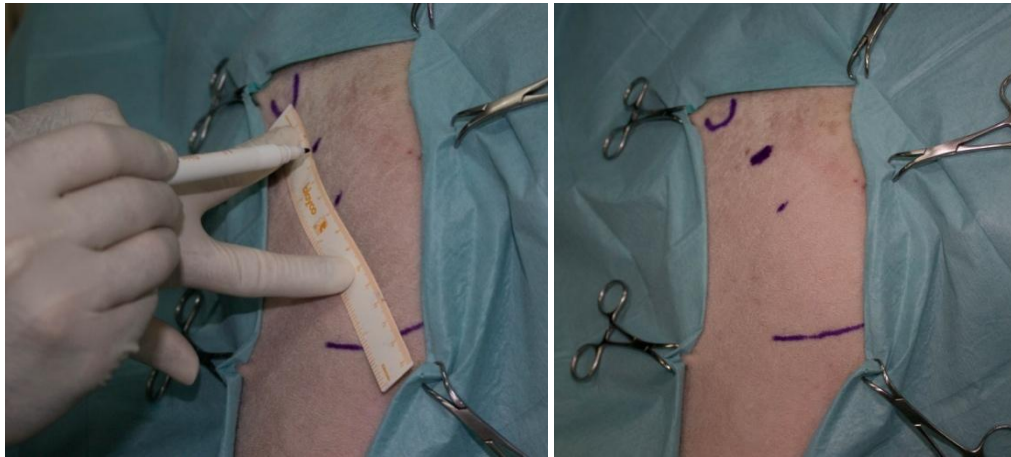


Figura 29. Marcaje de la localización anatómica exacta de la zona de la lesión en el músculo bíceps femoral, a mitad de distancia entre el trocánter mayor del fémur y el punto medio diafisario (**izquierda**). Referencias anatómicas marcadas, destacando la zona donde se produce la lesión (zona teñida más gruesa) (**derecha**).

En primer lugar, se realizó una evaluación ecográfica del músculo bíceps femoral en toda su extensión, con el uso de un equipo de ecografía portátil (Aloka® Prosound C3; Aloka, Tokio, Japón) con un transductor lineal multifrecuencia (7 – 12 MHz) (Aloka® UST-TL07; Aloka, Tokio, Japón). Para asegurar una buena conducción de los ultrasonidos, y una correcta adaptación del transductor del ecógrafo a la región a examinar, se utilizó gel de ecografía en el interior de un protector de la sonda (**Figura 30**). El objetivo del examen ecográfico inicial, fue descartar la presencia de una lesión muscular previa, que el músculo presenta un aspecto ecográfico normal (sin zonas de fibrosis, hematoma, edema), y que en la zona de incisión quirúrgica no existiera ninguna estructura vascular o nerviosa de calibre apreciable (**Figura 30**).



Figura 30. Aplicación de gel a la zona de emisión de ultrasonidos del transductor lineal (**arriba izquierda**). Empleo de un protector de sonda, que junto con el gel, se asegura un contacto perfecto entre la zona del músculo y el transductor del ecógrafo (**arriba derecha**). Evaluación ecográfica del músculo bíceps femoral, previo a la rotura quirúrgica (**abajo izquierda**). Aspecto ecográfico normal del músculo bíceps femoral (**abajo derecha**).

Para la laceración muscular quirúrgica, se utilizó una hoja de bisturí n°22 (Aesculap AG, BBraun, Tuttlingen, Alemania). El cirujano llevó a cabo una inciso-punción, dirigiendo la hoja de bisturí, con un ángulo de 45° con respecto a la piel que recubre el músculo bíceps femoral en la zona elegida. En todo momento de forma ecoguiada, se introdujo el bisturí hacia el espesor del músculo bíceps femoral, de manera que se provocó una laceración quirúrgica que involucraba sobre un 70% de las fibras que componen la totalidad del músculo (**Figura 31**). Se consideró de especial atención no dañar estructuras vasculares y nerviosas detectadas por ecografía. En caso de hemorragia, se mantuvo durante unos minutos una gasa haciendo compresión en el lugar de la lesión hasta que se controló la salida de sangre.

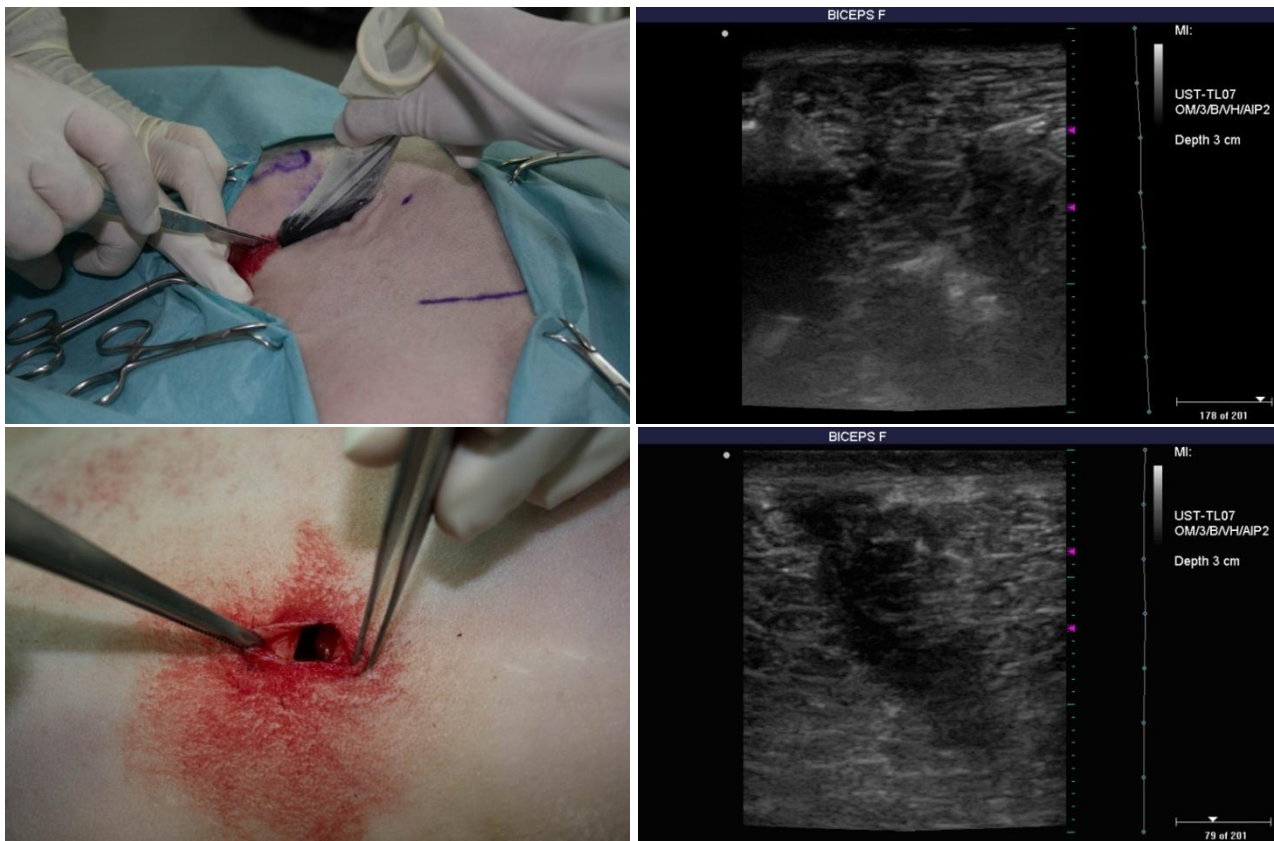


Figura 31. Inciso-punción con una hoja de bisturí n°22 de forma ecoguiada sobre el músculo bíceps femoral (**arriba izquierda**). Imagen ecográfica donde se observa el borde superior del bisturí, con su respectiva sombra acústica, durante la laceración muscular (**arriba derecha**). Aspecto externo de la lesión provocada quirúrgicamente (**abajo izquierda**). Aspecto ecográfico de la lesión muscular de grado II tras la cirugía (**abajo derecha**).

A continuación se procedió al cierre de la fascia externa que cubre el músculo bíceps femoral en la zona lesionada, siguiendo un patrón de sutura simple discontinuo, con el uso de hilo de sutura monofilamento sintético reabsorbible (poligliconato, Monosyn™ USP 2-0; BBraun, Barcelona, España) (**Figura 32**). Para finalizar, se procedió al cierre de la piel, siguiendo un patrón en “X” discontinuo. Para ello se empleó el mismo hilo de sutura utilizado para la reconstrucción de la fascia que cubre al músculo bíceps femoral (**Figura 32**).



Figura 32. Cierre de la fascia que cubre al músculo bíceps femoral en la zona dañada quirúrgicamente (**izquierda**). Cierre de piel (**derecha**).

Se cubrió la herida con spray de aluminio (Aludermín®, Chemical Iberica, Salamanca, España), por su efecto protector sobre la zona de incisión en la piel (**Figura 33**). Posteriormente, se procedió al cambio de decúbito del animal para llevar a cabo el mismo procedimiento sobre el bíceps femoral de la extremidad posterior izquierda.



Figura 33. Animal tras la cirugía, con la zona de la incisión cubierta con Aludermín®, para proteger la herida durante el postoperatorio.

Como antibioterapia preventiva se utilizó amoxicilina 15 mg/kg (Penimox LA[®], Bayer, Barcelona, España) administrada vía intramuscular en la musculatura tricipital de uno de los miembros torácicos, en el momento de la cirugía y a las 48 horas. Como terapia analgésica, se administró buprenorfina 0.02 mg/kg/8 horas (Buprex[™] 0.3 mg; Schering-Plough, Madrid, España) vía intramuscular durante 5 días después de la intervención quirúrgica.

En ninguno de los casos fue administrada terapia anti-inflamatoria, con el objetivo de poder valorar de forma precisa el efecto del PRGF sobre la fase inflamatoria del proceso de reparación tras producirse una rotura muscular de grado II.

Todos los animales fueron intervenidos por el mismo cirujano, para evitar la variabilidad asociada al operador. Tras la cirugía, los individuos fueron hospitalizados durante el período de estudio para un control post-operatorio exhaustivo, tanto del estado general de los individuos, como de las heridas quirúrgicas (limpieza y evaluación diaria).

7.4- Obtención y aplicación de PRGF en la rotura muscular de grado II en el bíceps femoral

A los tres días de la cirugía, y previo a la sedación de los animales, se extrajeron cuatro tubos de sangre de la vena yugular externa de cada individuo. Los tubos empleados, así como el protocolo de obtención de PRGF utilizado para la especie ovina, han sido descritos en el apartado “Obtención y aplicación del PRGF en el tendón de Aquiles reparado” del Material y Método del primer estudio experimental de la presente tesis doctoral. Al igual que anteriormente, se obtuvieron 2 ml de PRGF para su infiltración en cada animal.

Primeramente se procedió a la limpieza y preparado de la zona de la piel de forma aséptica. Tras la localización y delimitado de la lesión por ecografía, se procedió al aspirado del hematoma que se ubicaba entre ambos muñones de las fibras musculares dañadas, con el uso de una aguja 21G (Aguja Sterican[®] 21G, BBraun Medica, Barcelona, España) y de forma ecoguiada (**Figura 34**).

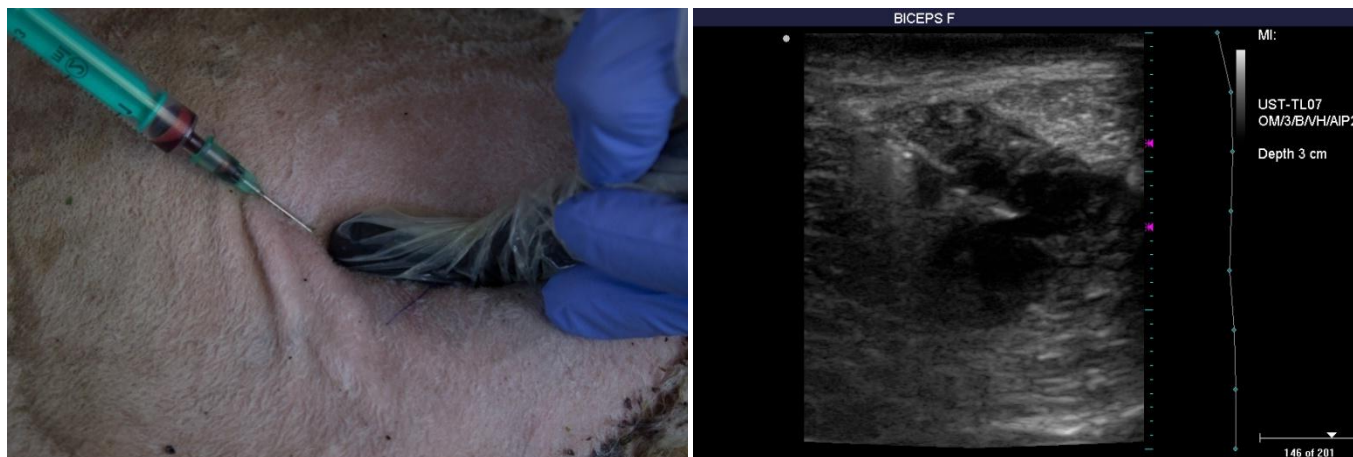


Figura 34. Aspirado de forma ecoguiada del hematoma formado entre los muñones de las fibras musculares rotas (**izquierda**). Imagen ecográfica donde se observa la aguja utilizada para la aspiración del hematoma durante el procedimiento (**derecha**).

Previo a la inyección del PRGF, se procedió a su activación con cloruro cálcico (Cloruro de Calcio 10%, BBraun Medical, Barcelona, España), en una proporción de 50 μ l por cada ml de plasma (**Figura 35**).



Figura 35. Adición de 0.1 ml de CaCl_2 a 2 ml de PRGF previo a su inyección intralesional en fase líquida

Con el uso de una aguja 21G (Aguja Sterican[®] 21G, BBraun Medica, Barcelona, España), se realizó su inyección intralesional en fase líquida de forma ecoguiada, método que ha sido utilizado previamente para la administración de PRP en una lesión muscular [44] (**Figura 36**). La extremidad contralateral fue infiltrada con 2 ml de solución salina junto con el mismo volumen de cloruro cálcico que en el caso del tratamiento con PRGF activado, igualmente de forma ecoguiada. El tratamiento con

PRGF y solución salina en la extremidad correspondiente, fue repetido una semana más tarde en el lote de animales de T2, y en dos ocasiones más, con un intervalo de una semana entre tratamientos, para el lote de animales de T4.

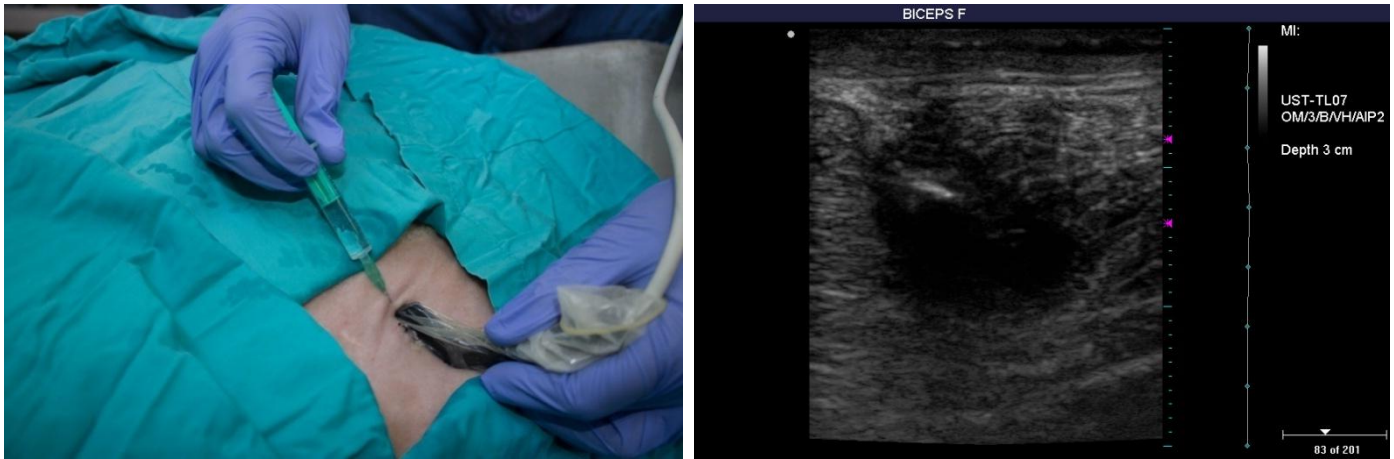


Figura 36. Inyección intralesional de forma ecoguiada, de PRGF o solución salina (izquierda). Imagen ecográfica de la lesión donde se observa la punta de la aguja y una zona anecogénica propia del líquido inoculado (derecha).

7.5- Estudio histopatológico y bioquímico del proceso de cicatrización de una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral

7.5.1- Eutanasia de los animales

Los animales del lote T1, T2 y T4 se sacrificaron a 1, 2 y 4 semanas del inicio del estudio, respectivamente, para llevar a cabo un estudio histopatológico y bioquímico del proceso de cicatrización muscular del bíceps femoral dañado quirúrgicamente. Previamente a la eutanasia, las ovejas fueron sedadas con xilacina 0.02 mg/kg (Xilagesic 2%® 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España), administrada vía intravenosa en la vena yugular externa. Tras la tranquilización y sedación de los animales, se procedió a la eutanasia de forma humanitaria mediante la inyección intravenosa de 15 ml de un agente eutanásico de uso veterinario (T61™; Intervet Schering Plough Animal Health; Salamanca, España).

7.5.2- Obtención y procesado de los músculos

Tras la eutanasia de los individuos, se tomó una biopsia amplia del vasto lateral del músculo cuádriceps, que fue considerado en el estudio como músculo esquelético normal intacto. A continuación, se procedió a la disección y extracción de ambos músculos bíceps femoral, incluyendo tanto la zona lesionada, como un amplio margen de músculo no lesionado (**Figura 37**).



Figura 37. Extracción de la zona de la lesión del músculo bíceps femoral con amplios márgenes que incluyen músculo esquelético intacto.

Posteriormente, se procedió a la división en dos mitades en sentido longitudinal a las fibras musculares, con la ayuda de un bisturí nº22 (Scalpel Blade Nº22, BBraun Aesculap, Barcelona, España). De esta manera, una mitad fue utilizada para su inclusión en formol al 10% diluido en tampón fosfato pH 7.0 durante 24h, y posterior estudio histoquímico. Para mantener la estructura histológica del músculo a estudiar hasta su fijación, fue necesario mantener el tejido sobre un depresor lingual de madera, anclado proximal y distalmente con una aguja, de manera que no se produce un acortamiento de las fibras musculares post-mortem (**Figura 38**).



Figura 38. Material necesario para la inclusión y fijación de las muestras de músculo en formol al 10% (**izquierda**). Porción de músculo bíceps femoral anclado a un depresor lingual, donde se identifica el extremo proximal de las fibras musculares, el número de oveja y la extremidad de donde procede (**derecha**).

La otra mitad del músculo lesionado fue utilizado para la recogida de muestras para su inclusión en glutaraldehído al 2% diluido en buffer fosfato pH 7.4, durante 12h a 4°C, que serán utilizadas para el posterior estudio en microscopía electrónica (**Figura 39**). Parte del tejido muscular en regeneración fue seleccionado para su introducción inmediata en nitrógeno líquido, para el posterior almacenamiento a -80°C, hasta su procesado y posterior estudio bioquímico, que describiremos posteriormente en el subapartado “Estudio bioquímico” del apartado “Obtención y procesado de los músculos”, del Material y Método del segundo experimento de la presente tesis doctoral.



Figura 39. Material necesario para la inclusión y fijación de las muestras de músculo en glutaraldehído al 2%.

7.5.2.1- Muestras para microscopía óptica

Tras el procesado en laboratorio, se obtuvieron tres bloques de parafina de cada músculo dañado, de los cuales un bloque incluye el corte longitudinal proximal, otro el corte longitudinal distal, y un tercero el corte transversal de las fibras musculares en regeneración (**Figura 40**). Del músculo esquelético normal se obtuvieron dos bloques de parafina, uno con la inclusión de un corte longitudinal, y el otro con un corte transversal de las fibras musculares.



Figura 40. Procesador de muestras para su posterior fijación en los bloques de parafina (**izquierda**). Cortes de tejido muscular para su fijación en bloques de parafina (3 por extremidad) (**derecha**).

7.5.2.2- Muestras para microscopía electrónica de transmisión

Tras 12 horas de fijación en glutaraldehído 2% a 4°C, las muestras se refijaron en tetróxido de osmio en solución 0.1 M de buffer fosfato (pH 7.4) durante 30 minutos, según la metodología descrita previamente por Sabatini et al [216]. Después se procedió a un lavado con solución buffer fosfato pH 7.4, seguido de una deshidratación en escala ascendente de alcoholes finalizando con la inclusión de las piezas de tejido muscular en Araldita.

7.5.3- Estudio histológico

7.5.3.1- Estudio histoquímico

De cada uno de los bloques de parafina obtenidos previamente, se extrajeron cuatro láminas de tejido no consecutivas, de 4 μm de grosor. Cada sección histológica fue montada en un portaobjetos para su posterior tinción: dos fueron teñidas con HE, y otras dos con TM.

Para estandarizar la selección de las zonas del tejido muscular a estudiar, y objetivizar el análisis lo máximo posible, se realizó un muestreo sistemático aleatorio mediante la superposición de una lámina de acetato punteada previamente, y se siguió el método de selección de campos microscópicos previamente descrito para el primer estudio experimental de la presente tesis doctoral. Las microfotografías fueron tomadas con el uso de un fotomicroscopio (Olympus BX43, Tokyo, Japón), con un controlador de la cámara digital adjunto (Olympus XC50, Tokyo, Japón) (**Figura 41**).



Figura 41. Fotomicroscopio (Olympus BX43, Tokyo, Japón), con un controlador de la cámara digital adjunto (Olympus XC50, Tokyo, Japón) conectado a un ordenador.

En cada uno de los cortes histológicos teñidos con HE y TM se tomaron 5 fotografías con una magnificación de x200. Todas las imágenes fueron identificadas y codificadas mediante un código numérico para llevar a cabo la evaluación de manera ciega. Las imágenes histológicas fueron analizadas con la ayuda del programa de análisis de la imagen ImageJ (Procesador de Imagen y Análisis en Java), previamente utilizado en estudios histológicos similares al llevado en el segundo estudio de la presente tesis doctoral [63].

La valoración microscópica del proceso de cicatrización muscular se realizó en base a unas variables histológicas previamente utilizadas para definir de una forma precisa el grado de evolución de la reparación del músculo en cuestión [39,63,96,247], y están basadas en la respuesta fisiológica normal del músculo ante una rotura de fibras de grado II. Las variables histológicas utilizadas fueron:

a) Densidad de células inflamatorias

La intensidad de la respuesta inflamatoria fue determinada a nivel histológico a través del conteo directo de células inflamatorias, y la posterior determinación de la densidad de estas células con respecto al área total muestreada.

b) Área vascular

Para calcular el área de la sección transversal de los vasos sanguíneos, fue necesario en primer lugar el marcaje manual del perímetro de los vasos. Posteriormente, al programa de análisis de la imagen ImageJ calculaba el área delineada en cada uno de los vasos sanguíneos.

c) Densidad vascular

El número de vasos sanguíneos marcados dividido entre el área total de tejido muestreada, fueron los parámetros utilizados para determinar esta variable.

d) FNC

Se llevó a cabo un conteo directo tanto del número de fibras musculares que presentaban el núcleo en posición central, como aquellas que se mostraban con su núcleo en posición periférica. Posteriormente, se calculó el porcentaje de FNC con respecto al total de fibras musculares cuantificadas. Este hallazgo histológico ha sido utilizado previamente como indicador de intensidad de regeneración muscular [63,96].

e) Área de fibrosis

Para la determinación del área de fibrosis en el músculo en regeneración, se utilizaron las imágenes obtenidas del tejido teñido con TM. El tejido fibrótico se corresponde con las zonas teñidas de azul. El área de fibrosis fue expresada en porcentaje con respecto al área total muestreada, de la misma forma que ha sido descrito en varios estudios previos [51,63,247].

7.5.3.2- Estudio con microscopía electrónica de transmisión

Sobre las piezas de tejido muscular incluidas en Araldita, se realizaron varios cortes de tejido semifinos y ultrafinos con el uso de un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó un doble contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para su estudio ultraestructural descriptivo, los cortes fueron observados y electronografiados en un microscopio electrónico de transmisión (CM10, Philips), del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Córdoba (**Figura 42**).



Figura 42. Microscopio electrónico de transmisión del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Córdoba.

7.5.4- Estudio bioquímico

El estudio bioquímico consistió en la extracción de ARN del tejido muscular, y el posterior estudio de RT-Q-PCR (Real-time Quantitative Polimerase Chain Reaction). Para dicho análisis se utilizaron las muestras de músculo almacenadas a -80°C .

7.5.4.1- Extracción de ARN del tejido muscular

Para llevar a cabo el proceso, aproximadamente 30 mg de tejido muscular fue disgregado y homogeneizado con el uso de un mortero, adicionando nitrógeno líquido durante el procedimiento para evitar la degradación del tejido (**Figura 43**).



Figura 43. Mortero de cerámica con el tejido muscular disgregado

A partir del tejido homogeneizado, se procedió al aislamiento del ARN con la adición de TRI reagent (Sigma-Aldrich CO, St Louis, MO). Brevemente, en una campana de extracción de gases se añadió 1 ml de TRI reagent por cada muestra de homogenado y posteriormente se adicionaron 200 μ l de cloroformo. Esto fue agitado con la ayuda de un vortex y se centrifugó a 14000 G durante 15 minutos, a 4°C. A continuación se recuperó la fase superior acuosa conteniendo el ARN de la muestra (aproximadamente 500 μ l) (**Figura 44**).

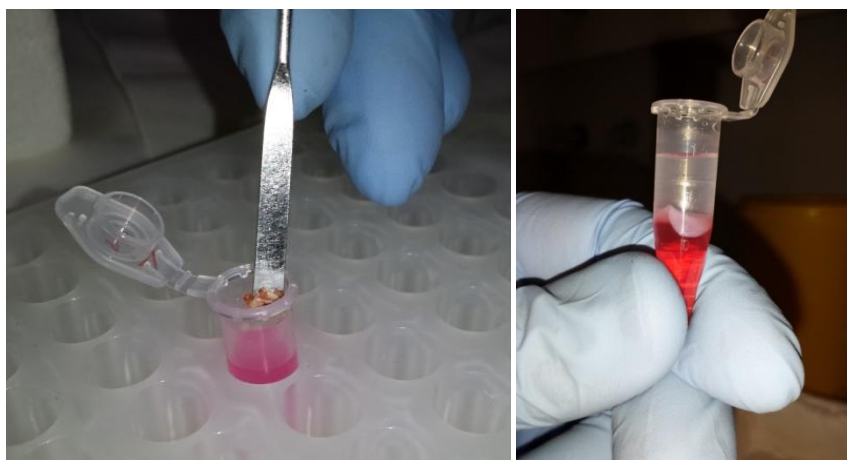


Figura 44. Adición del homogenado a la solución TRI reagent (**izquierda**). Tras la centrifugación, se obtiene una solución en la cual el ARN se localiza en la fase superior acuosa (**derecha**).

Para precipitar el ARN, se añadió igual volumen de isopropanol y se mantuvo a -80°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 14000 G durante 10 minutos, a 4°C. Los pellets de las muestras fueron lavados con etanol 70%, y a continuación se centrifugaron a 14000 G durante 5 minutos, a 4°C. A continuación, se retiró el etanol y las muestras se secaron al aire en una campana de extracción de gases para permitir la evaporación de los restos de etanol. Una vez seco, se resuspendió el pellets de ARN en 100 µl de agua libre de DNAsa y RNAsa, las muestras se mantuvieron a 55°C durante 5 minutos y se pasaron a hielo (choque térmico).

Seguidamente, la cantidad y calidad del ARN extraído fue cuantificada mediante espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

7.5.4.2- Estudio de RT-Q-PCR

Primeramente, 1 µg del ARN total extraído previamente fue tratado con el kit “DNase amplification grade” (Sigma-Aldrich CO) según las instrucciones del fabricante para eliminar el posible ADN presente en la solución de ARN. A continuación, la RT-PCR a tiempo real fue realizada con 50 nanogramos de ARN total, tratado con DNAsa usando el kit “SensiFAST SYBR No-ROX One-Step” (Bioline Reagents Limited, UK) para un volumen final de 20 µl siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primers utilizados para la reacción de PRC de los genes MyoD1, Myf5, Myog, Mstn y GAPDH son los mostrados en la **tabla 11**. La transcripción inversa y la amplificación de los productos fueron llevadas a cabo con el equipo “Lightcycler 480” (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). La expresión de los genes diana se normalizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, usando como control constitutivo la expresión de GAPDH.

Gen	Forward	Reverse
MyoD1	5'-GCA ATC CGC TAT ATC GAA GG-3'	5'-GTA AGC GCG GTC GTA GC-3'
Myf5	5'-AAG GTG GAG ATC CTC AGG AA-3'	5'-ATT CAG GCA TGC CAT CAG AGC AAC-3'
Myog	5'-CCG TGG GCG TGT AAG GTG TG-3'	3'-CCT CTG GTT GGG GTT GAG CAG-5'
Mstn	5'-CCA GGA GAA GAA GGA CTG AAT C-3'	3'-AAA AAT TCA CAT TCT CCA GAG CAG T-5'
GAPDH	5'-CCT GGA GAA ACC TGC CAA GT-3'	3'-GCC CAA TTC ATT GTC GTA CCA-5'

Tabla 11. Secuencias de los primers usados para la RT-Q-PCR.

7.6- Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa de análisis estadístico SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Todas las variables fueron analizadas para comprobar su distribución normal con el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables del estudio histoquímico (Densidad de células inflamatorias, área vascular, densidad vascular, FNC y área de fibrosis) fueron expresadas como media \pm dt. Las variables del estudio bioquímico (MyoD1, Myf5, Myog, Mstn) fueron expresadas como mediana \pm rango. Para su análisis se diseñó un modelo lineal general mixto, que consistió en realizar un estudio comparativo de cada variable con respecto al tratamiento recibido: PRGF, Solución salina o músculo normal intacto. Además, cada variable fue analizada con respecto a los diferentes tiempos de cicatrización estudiados (T1, T2 y T4). Por último se llevó a cabo un test post hoc de Bonferroni. El nivel de significación fue establecido cuando $p < 0.05$.

VIII. Resultados Estudio 2

8.1- Modelo experimental de rotura muscular de grado II del bíceps femoral en la especie ovina

Durante el desarrollo del modelo animal de rotura muscular de grado II en el bíceps femoral no se registraron complicaciones perioperatorias. Todos los animales completaron el período de estudio sin registrarse ninguna baja a lo largo del experimento (**Figura 45**).



Figura 45. Grupo de animales durante el período post-operatorio: se observa a los animales con la zona de la herida quirúrgica protegida con un apósito de espray de plata.

Con la realización del modelo experimental descrito, se consiguió una laceración quirúrgica en el músculo bíceps femoral de ambas extremidades de cada uno de los animales, equivalente a una rotura muscular de grado II, según la escala de clasificación clínica de las lesiones musculares propuesta por MS et al. [190]. La lesión muscular de grado II fue reproducida en todos los animales del estudio de forma homogénea y repetible, provocando una discontinuidad de entorno a un 70% de las fibras que conforman el músculo bíceps femoral (**Figura 46**).



Figura 46. Aspecto ecográfico de una rotura muscular de grado II. Se observa una zona anecogénica correspondiente con el hematoma alojado entre los muñones de las fibras musculares rotas.

8.2- Estudio histológico

8.2.1- Estudio histoquímico

Los datos obtenidos referentes a las variables histológicas estudiadas sobre las preparaciones de tejido muscular teñidas con HE y TM se muestran en la **tabla 12**.

Variable	Lote	Grupo	Valor (media \pm dt)
Densidad de células inflamatorias (células/mm ²)	T1	PRGF	47 \pm 13 ^{+,*}
		Solución salina	87 \pm 18 ^{+,*}
		Normal	0 \pm 0
	T2	PRGF	52 \pm 16 ^{+,*}
		Solución salina	101 \pm 40 ^{+,*}
		Normal	0 \pm 0
	T4	PRGF	59 \pm 16 ^{+,*}
		Solución salina	107 \pm 24 ^{+,*}
		Normal	0 \pm 0
Área vascular (μ m ²)	T1	PRGF	303 \pm 77 ^{+,*}
		Solución salina	497 \pm 127 ^{+,*}
		Normal	40 \pm 1
	T2	PRGF	173 \pm 25 ^{+,*}
		Solución salina	373 \pm 105 ^{+,*}
		Normal	40 \pm 2
	T4	PRGF	160 \pm 70 ^{+,*}
		Solución salina	224 \pm 96 ^{+,*}
		Normal	39 \pm 2
Densidad vascular (vasos sanguíneos/mm ²)	T1	PRGF	21 \pm 6 ⁺
		Solución salina	26 \pm 6 ⁺
		Normal	12 \pm 2
	T2	PRGF	16 \pm 4 ⁺
		Solución salina	20 \pm 4 ⁺
		Normal	10 \pm 3
	T4	PRGF	14 \pm 3 ^{+,*}
		Solución salina	20 \pm 3 ^{+,*}
		Normal	10 \pm 2

FNC (%)	T1	PRGF	27±5 ^{+,*}
		Solución salina	16±5 ^{+,*}
		Normal	0±0
	T2	PRGF	36±11 ^{+,*}
		Solución salina	25±5 ^{+,*}
		Normal	0±0
	T4	PRGF	50±10 ^{+,*}
		Solución salina	34±6 ^{+,*}
		Normal	0±0
Área de fibrosis (%)	T1	PRGF	24±3 ^{+,*}
		Solución salina	32±5 ^{+,*}
		Normal	0±0
	T2	PRGF	31±5 ^{+,*}
		Solución salina	42±4 ^{+,*}
		Normal	0±0
	T4	PRGF	22±3 ^{+,*}
		Solución salina	34±5 ^{+,*}
		Normal	0±0

Tabla 12. Densidad de células inflamatorias, área vascular, densidad vascular, FNC y área de fibrosis en los músculos normales sanos, en los músculos en regeneración con una rotura de grado II tratados con PRGF, y aquellos tratados con solución salina; a 1 (T1), 2 (T2) y 4 (T4) semanas del daño muscular. ⁽⁺⁾ Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al músculo normal ($p<0.05$). ^(*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre los músculos tratados con PRGF, y los músculos tratados con solución salina ($p<0.05$).

8.2.1.1- Infiltrado celular inflamatorio

El músculo esquelético normal intacto mostró a nivel histológico una ausencia de infiltrado de células inflamatorias. Por el contrario, tras producirse una laceración quirúrgica equivalente a una lesión de grado II en el bíceps femoral, se experimentó un

incremento brusco significativo en ambos grupos de tratamiento PRGF y Salino, con respecto a los músculos intactos. Al comparar el grupo de músculos infiltrados con PRGF, con aquellos tratados con Solución salina, se observó desde la primera semana tras producirse la rotura muscular, una mayor densidad de células inflamatorias en el grupo Salino, en comparación con los músculos que se beneficiaron del tratamiento con PRGF (**Figura 47**). Esta diferencia se mantuvo a lo largo del experimento durante las 4 semanas después de producirse el daño muscular ($p=0.001$) (**Figura 48**).

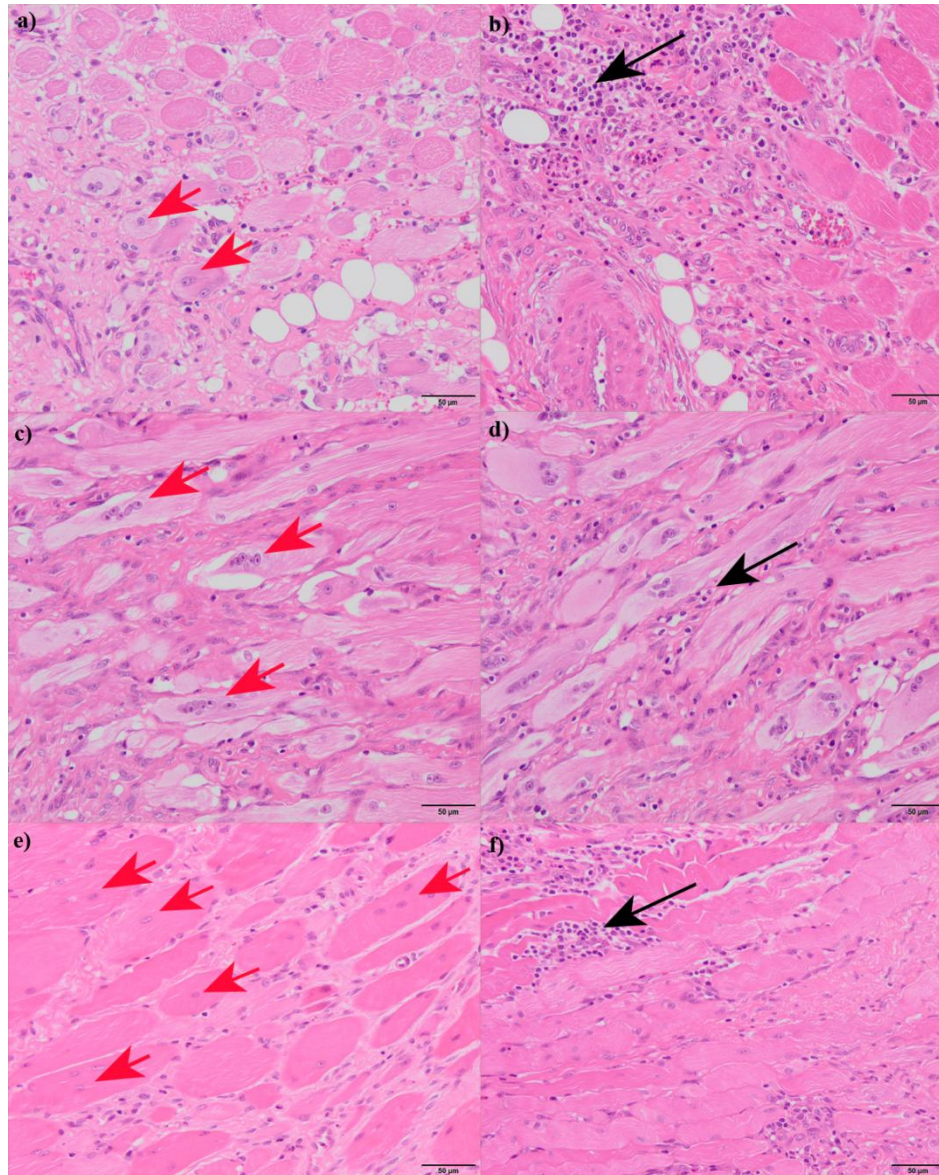


Figura 47. Imágenes histológicas representativas teñidas con HE de una lesión muscular de grado II; tratadas con PRGF (**a, c, e**) o solución salina (**b, d, f**); a 1 (**a, b**), 2 (**c, d**) y 4 (**e, f**) semanas tras el daño muscular. La flecha negra señala el infiltrado celular inflamatorio; la flecha roja señala las FNC. Los músculos tratados con PRGF muestran un menor infiltrado celular inflamatorio y un mayor porcentaje de FNC que los músculos infiltrados con Solución salina.

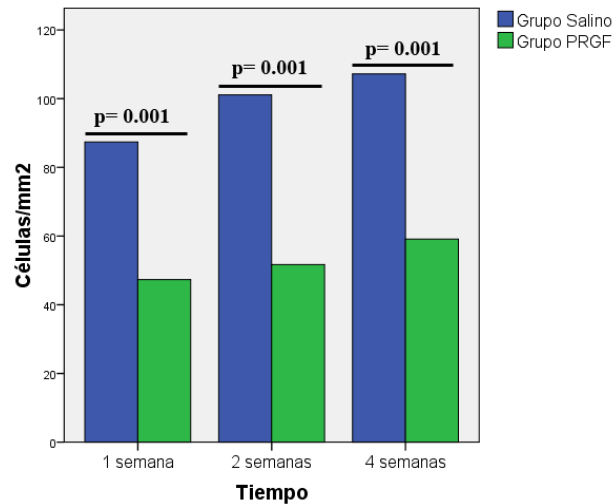


Figura 48. Representación gráfica de la densidad de células inflamatorias en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

8.2.1.2- Respuesta vascular

Respecto al grado de vascularización, en el músculo esquelético intacto se describieron a nivel histológico la presencia de pequeños capilares distribuidos de forma homogénea, con una densidad vascular moderada. Tras producirse una lesión muscular de grado II, ambos grupos de músculos tratados con PRGF y con solución salina, experimentaron un incremento brusco en el área vascular, lo cual indicaba la presencia de capilares sanguíneos de mayor tamaño que en el músculo esquelético sano. Cuando se llevó a cabo la comparación estadística entre ambos grupos de tratamiento PRGF y Salino, se describió una mayor área vascular, estadísticamente significativa en los músculos inyectados con solución salina, que en los tratados con PRGF. Esta diferencia se mantuvo durante las dos primeras semanas de estudio (T1: $p=0.023$; T2: $p=0.001$) (**Figura 49**).

En cuanto a la densidad vascular se refiere, se describió un aumento estadísticamente significativo en ambos grupos de tratamiento PRGF y Salino, con respecto a los músculos intactos. Ambos grupos de músculos dañados quirúrgicamente e infiltrados con PRGF y Solución salina experimentaron una disminución en la densidad vascular progresiva a lo largo del estudio. A las cuatro semanas del daño muscular, los músculos infiltrados con solución salina mostraron una mayor densidad

vascular mantenida en este tiempo, que los músculos tratados con PRGF ($p=0.019$) (Figura 50).

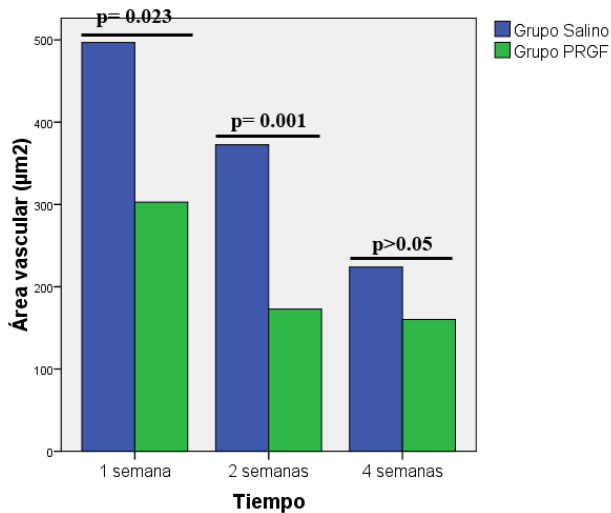


Figura 49. Representación gráfica del área vascular en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

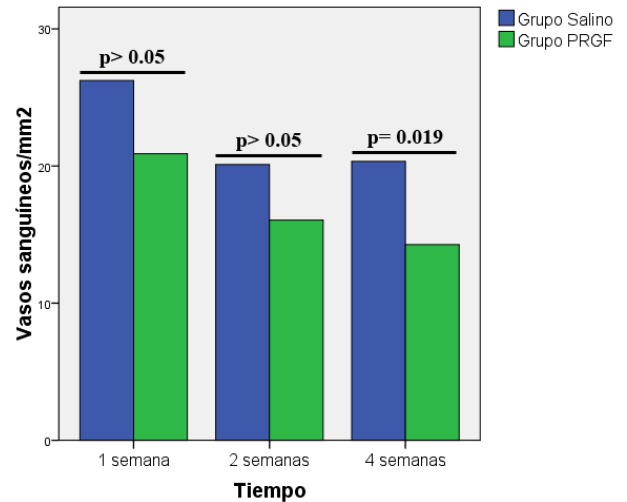


Figura 50. Representación gráfica de la densidad de vasos sanguíneos en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

8.2.1.3- FNC

El músculo normal intacto no mostró a nivel histológico la presencia de fibras musculares con el núcleo central. El porcentaje de FNC experimentó un aumento progresivo de T1 a T4, estadísticamente significativo en los músculos dañados con respecto al músculo normal intacto. A lo largo de todo el período de estudio, los músculos infiltrados con PRGF mostraron un mayor porcentaje de FNC estadísticamente significativo, en comparación con los músculos del grupo Salino (Figura 47). Esta diferencia se mantuvo a lo largo de todo el período del experimento hasta las cuatro semanas ($p=0.001$) (Figura 51).

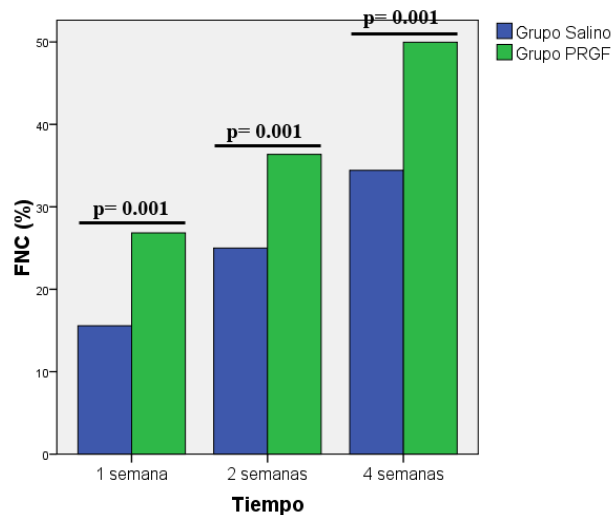


Figura 51. Representación gráfica del porcentaje de FNC en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

8.2.1.4- Área de fibrosis

En las secciones de tejido muscular teñidas con TM, se evaluó el porcentaje de área de fibrosis muscular tras producirse una lesión de grado II. En el músculo esquelético normal, tal y como se había confirmado ecográficamente, se describió una ausencia de tejido fibroso patológico. A lo largo del proceso de reparación muscular, se describió una deposición de tejido conectivo en todos los músculos dañados quirúrgicamente, tanto los tratados con PRGF, como aquellos infiltrados con solución salina. De forma paralela, se produjo un aumento significativo del porcentaje de fibrosis hasta la segunda semana de estudio. A continuación, se describe una disminución del área de fibrosis al final del experimento, para ambos grupos de tratamiento estudiados. La comparación entre los grupos PRGF y Salino, mostró un menor porcentaje de área de fibrosis estadísticamente significativo en los músculos tratados con PRGF, en comparación con los músculos infiltrados con solución salina (**Figura 52**). Este hallazgo estadístico se mantuvo constante hasta el final del experimento a las 4 semanas del inicio de estudio ($p=0.002$) (**Figura 53**).

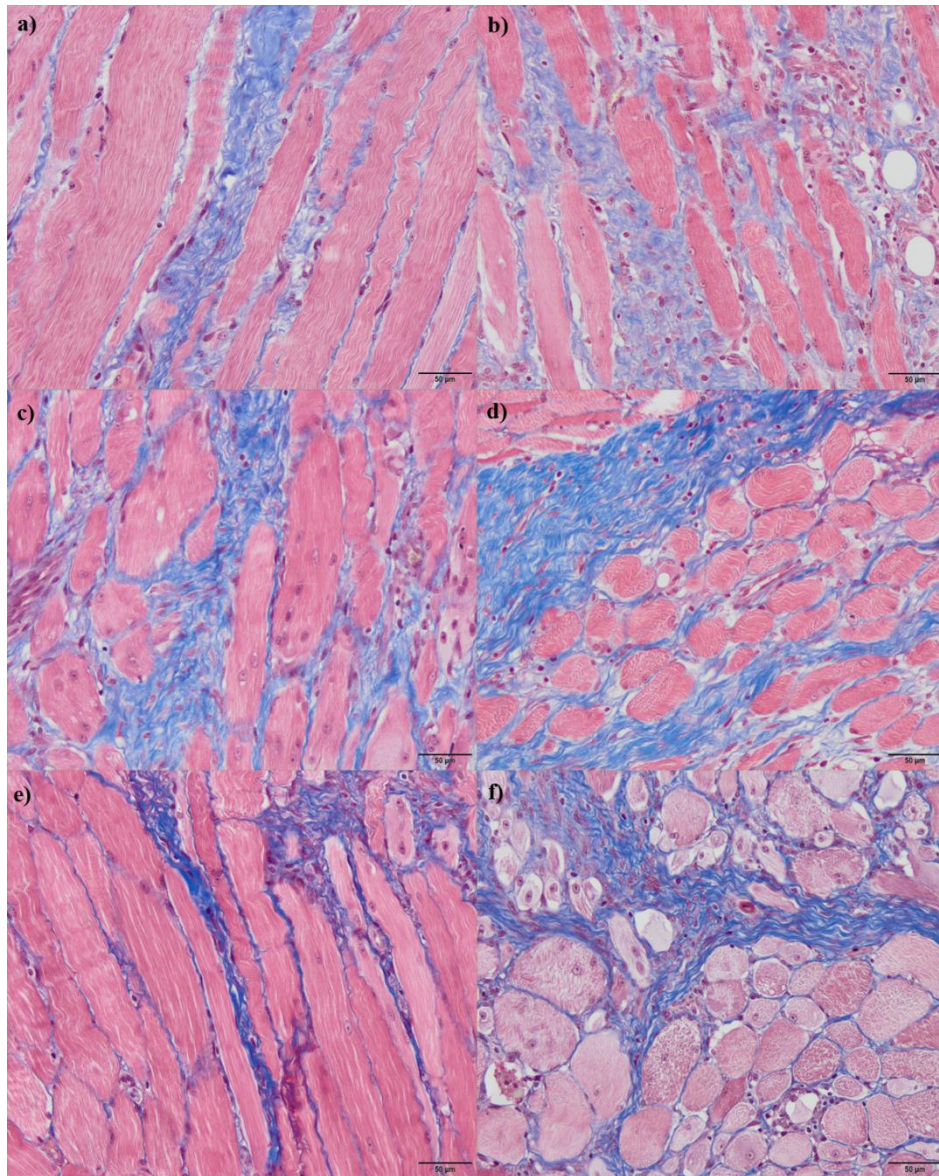


Figura 52. Imágenes histológicas representativas teñidas con TM de una lesión muscular de grado II; tratadas con PRGF (**a, c, e**) o Solución salina (**b, d, f**); a 1 (**a, b**), 2 (**c, d**) y 4 (**e, f**) semanas tras el daño muscular. Los músculos tratados con PRGF muestran una menor área de fibrosis (teñida de azul) que los músculos infiltrados con Solución salina.

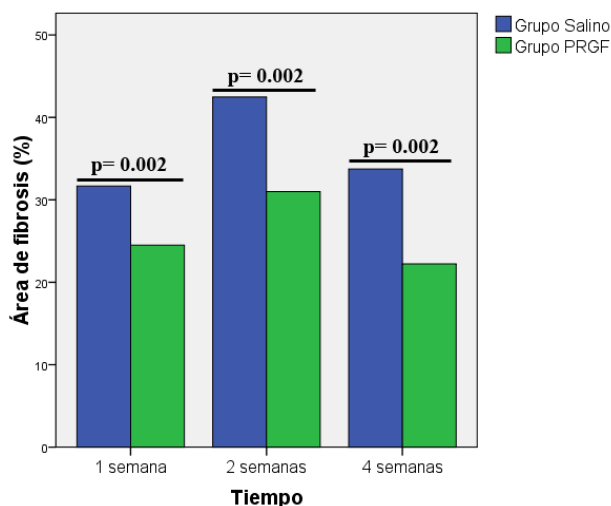


Figura 53. Representación gráfica del porcentaje de área de fibrosis en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

8.2.2- Estudio con microscopía electrónica de transmisión

La ultraestructura muscular observada con microscopía electrónica de transmisión reveló en el músculo esquelético intacto una disposición de los sarcómeros paralelos unos a otros y distribuidos a lo largo de las fibras musculares. Tras producirse un daño muscular, en todos los músculos dañados quirúrgicamente, se detectaron fenómenos de hipertrofia, en diferente presentación, dependiendo de la terapia que habían recibido con PRGF o con solución salina a lo largo del experimento. A 1 y 2 semanas del daño muscular, los músculos tratados con PRGF presentaron un edema moderado, propio de la fase inflamatoria de la cicatrización muscular. Además, estos músculos presentaron una pérdida moderada de la estructura del tejido conectivo del músculo esquelético. En contraposición a lo observado anteriormente a 1 y 2 semanas del daño muscular, el grupo de tratamiento con solución salina presentó un edema más difuso, con presencia de dilatación de los túbulos T y el retículo sarcoplásmico, así como una mayor desorganización de la estructura del tejido conectivo. A las 4 semanas de producirse el daño muscular, los músculos del grupo PRGF mostraron cambios en su estructura propios de fenómenos de hipertrofia fisiológica, con presencia de fibrillas musculares de ondulación moderada (**Figura 54a & b**). Por el contrario, el grupo tratado con solución salina mostraron cambios en la estructura muscular propios de una

hipertrofia patológica, con fibrillas creciendo de forma descoordinada, y no paralelas al eje principal de la fibra muscular (**Figura 54c & d**). Por otro lado, se muestran gran cantidad de mitocondrias asociadas a la banda “Z” del sarcómero de los músculos tratados con PRGF (**Figura 54b**), mientras que los músculos del grupo Salino presentaban una menor densidad de mitocondrias, y a veces no asociadas al sarcómero (**Figura 54d**).

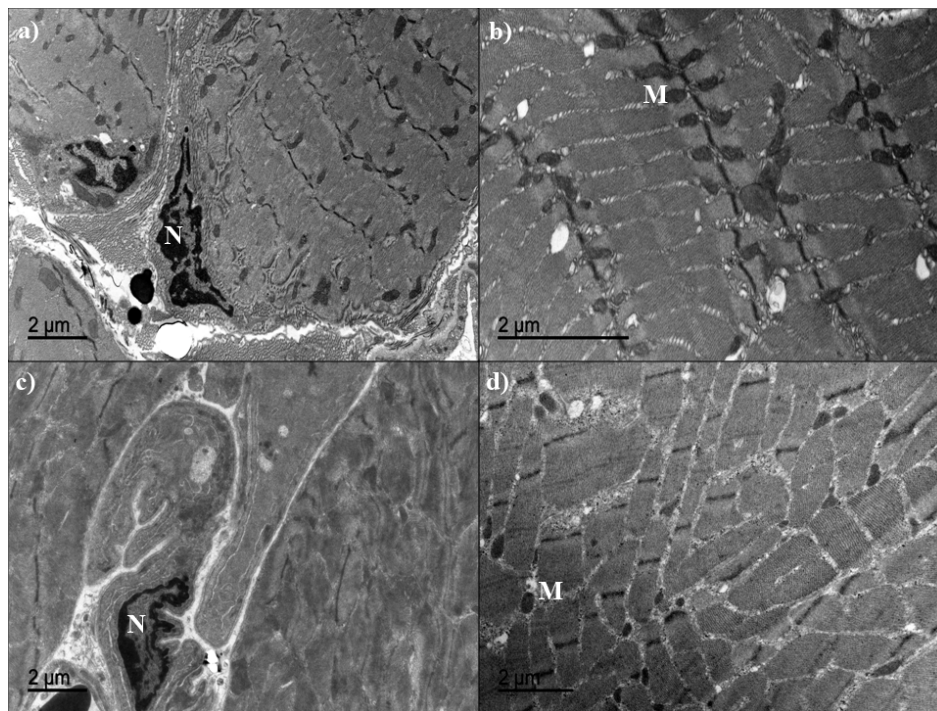


Figura 54. Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de una lesión muscular de grado II que ha sido tratada con PRGF (**a & b**), o con solución salina (**c & d**); a las cuatro semanas de la lesión. N: núcleo de la fibra muscular; M: mitocondria. Los músculos infiltrados con PRGF mostraron cambios propios de una hipertrofia fisiológica, con fibrillas de ondulación moderada y alta densidad de mitocondrias asociadas a la banda “Z” del sarcómero. Sin embargo, los músculos del grupo tratado con solución salina mostraron cambios propios de una hipertrofia patológica, con fibrillas creciendo de forma descoordinada, y con presencia de una baja densidad de mitocondrias distribuidas al azar en el tejido muscular.

8.3- Estudio bioquímico

Los datos de los niveles de expresión determinados por RT-Q-PCR para los genes MyoD1, Myf5, Myog y Mstn, en el músculo esquelético normal intacto, y en los

músculos en regeneración tras una rotura de grado II, tratados con PRGF o con solución salina, se muestran en la **tabla 13**.

Variable	Lote	Grupo	Valor (mediana \pm rango)
MyoD1	T1	PRGF	22,97 \pm 35,43 ^(*)
		Solución salina	2,52 \pm 18,32 ^(*)
		Normal	0,90 \pm 0,74
	T2	PRGF	28,67 \pm 24,69 ^(*)
		Solución salina	26,39 \pm 15,13 ^(*)
		Normal	0,90 \pm 0,74
	T4	PRGF	54,25 \pm 51,59 ^(*)
		Solución salina	28,08 \pm 22,94 ^(*)
		Normal	0,90 \pm 0,74
Myf5	T1	PRGF	24,80 \pm 35,17 ^(*)
		Solución salina	9,53 \pm 26,61 ^(*)
		Normal	0,78 \pm 0,62
	T2	PRGF	49,59 \pm 54,94 ^(*)
		Solución salina	75,69 \pm 79,86 ^(*)
		Normal	0,78 \pm 0,62
	T4	PRGF	81,69 \pm 41,25 ^(*)
		Solución salina	95,14 \pm 88,79 ^(*)
		Normal	0,78 \pm 0,62

Myog	T1	PRGF	23,43 ± 33,78
		Solución salina	8,36 ± 34,37 ^(*)
		Normal	0,83 ± 0,48
	T2	PRGF	31,87 ± 23,73 ^(*)
		Solución salina	25,18 ± 17,79 ^(*)
		Normal	0,85 ± 1,02
	T4	PRGF	43,83 ± 27,45 ^(*)
		Solución salina	31,87 ± 20,46 ^(*)
		Normal	0,85 ± 0,51
Mstn	T1	PRGF	0,22 ± 0,23 ^(*)
		Solución salina	0,22 ± 0,65
		Normal	0,76 ± 1,76
	T2	PRGF	0,53 ± 0,69
		Solución salina	0,81 ± 0,70
		Normal	1,62 ± 1,49
	T4	PRGF	0,75 ± 0,38
		Solución salina	0,59 ± 0,27
		Normal	0,76 ± 1,03

Tabla 13. Nivel de expresión de los genes MyoD1, Myf5, Myog y Mstn, en los músculos normales no dañados quirúrgicamente, en los músculos con una lesión de grado II tratados con PRGF, y en aquellos tratados con solución salina; a 1 (T1), 2 (T2) y 4 (T4) semanas del daño muscular. ^(*) Indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al músculo normal (p<0.05).

El nivel de expresión de los genes estudiados para la determinación bioquímica de la intensidad de regeneración muscular, mostraron los siguientes cambios:

MyoD1

El nivel de expresión de MyoD1 experimentó un incremento estadísticamente significativo tras producirse la rotura muscular de grado II, en comparación con el músculo esquelético sano, desde la primera semana tras el inicio del estudio (p=0.001).

Con el transcurso del proceso de reparación muscular, se muestra un incremento estadísticamente significativo en la expresión de MyoD1 en la semana 2 y 4 con respecto a la semana 1 ($p=0.004$ y $p=0.011$, respectivamente), con lo cual indicaba un incremento progresivo en la activación del proceso de regeneración muscular a lo largo del estudio (**Figura 55**). Al comparar el efecto del tratamiento con PRGF sobre el nivel de activación de los mecanismos de regeneración muscular, con aquellos músculos infiltrados con solución salina, se observa una tendencia clara, indicativa de una mayor expresión de MyoD1 en los músculos que se beneficiaron de la terapia con PRGF. Este hallazgo laboratorial puede ser sugerente de que en los músculos tratados con PRGF se está produciendo una mayor activación del proceso de regeneración de las fibras musculares dañadas.

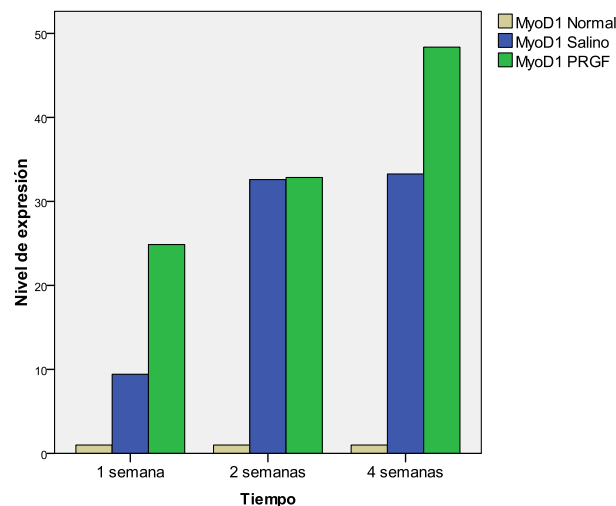


Figura 55. Representación gráfica del nivel de expresión de MyoD1 en el músculo esquelético normal, en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF; a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

Myf5

El nivel de expresión de Myf5 mostró un incremento estadísticamente significativo en ambos grupos PRGF y Salino tras producirse el daño muscular, con respecto al músculo esquelético normal ($p=0.001$). Con el transcurso del proceso de regeneración muscular, tanto en el grupo PRGF como en el grupo Salino, se produjo un incremento significativo a las 2 y 4 semanas, con respecto al lote de animales de T1 ($p=0.004$). No se registraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos PRGF y Salino a lo largo del estudio (**Figura 56**).

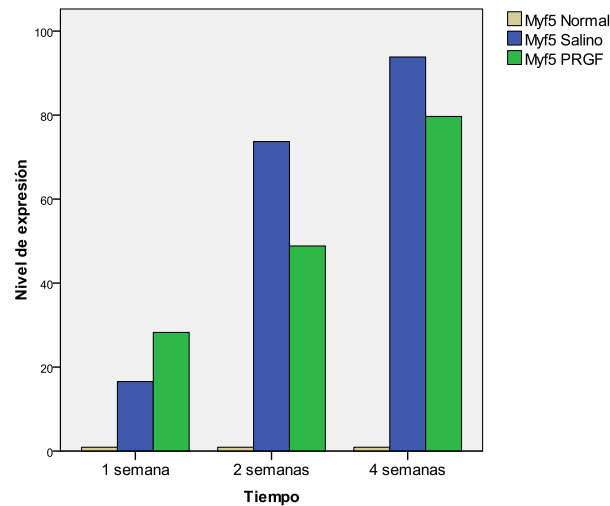


Figura 56. Representación gráfica del nivel de expresión de Myf5 en el músculo esquelético normal, en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF; a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

Myog

El nivel de expresión de Myog mostró un incremento estadísticamente significativo en el tejido muscular dañado, en comparación con el músculo esquelético normal ($p=0.018$). Con el transcurso del período de estudio, no se describen diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo. En el análisis comparativo entre los grupos Salino y PRGF en los diferentes tiempos de estudio, no se registraron diferencias significativas (**Figura 57**).

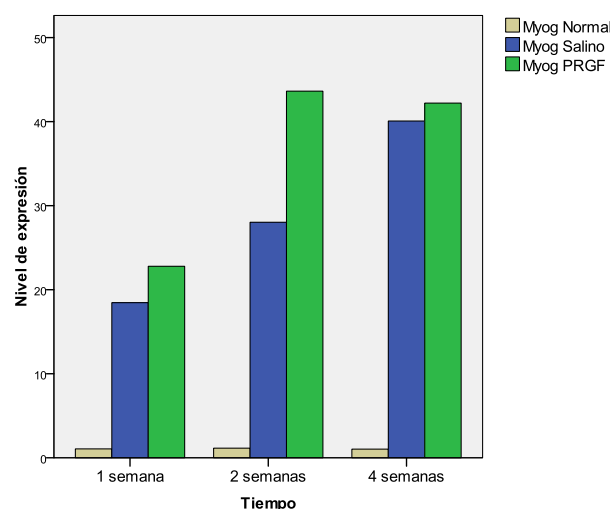


Figura 57. Representación gráfica del nivel de expresión de Myog en el músculo esquelético normal, en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF; a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

Mstn

La *Mstn* se trata de un gen que está estrechamente relacionado con la inhibición de los mecanismos de regeneración muscular [180,184,233]. Tras producirse la rotura muscular de grado II en el bíceps femoral, se observó una disminución en los niveles de expresión de *Mstn*, tanto en los músculos del grupo PRGF, como en aquellos músculos infiltrados con solución salina, con respecto al músculo esquelético intacto, en todos los tiempos de estudio. Esto fue indicativo de que se estaba produciendo un mecanismo de activación de regeneración muscular, y por lo tanto, una inhibición en los niveles de producción de *Mstn*. No se describieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos PRGF y Salino a lo largo del estudio (**Figura 58**).

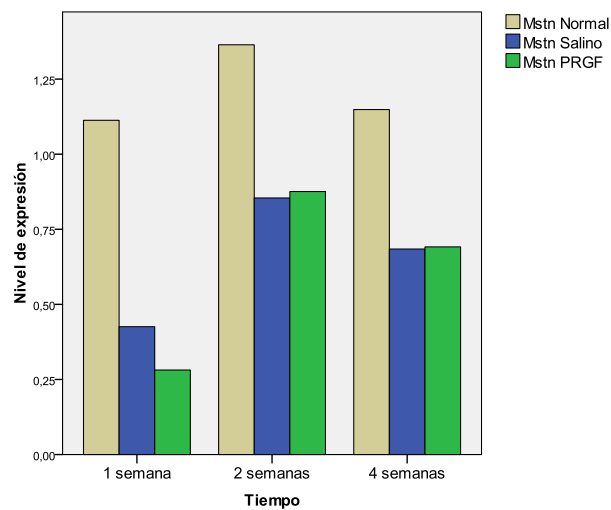


Figura 58. Representación gráfica del nivel de expresión de *Mstn* en el músculo esquelético normal, en los músculos en regeneración del grupo Salino y grupo PRGF; a 1, 2 y 4 semanas de producirse una lesión muscular de grado II en el bíceps femoral.

IX. Discusión

Estudio 2

9.1- Empleo de PRGF en una rotura muscular de grado II

El daño muscular es una de las patologías más frecuentes relacionadas con el mundo deportivo, tanto amateur como a nivel profesional [7,73,93]. Debido a la elevada incidencia en este tipo de lesiones, así como al gran porcentaje de recidivas asociadas a una mala recuperación, la comunidad científica se plantea como principal objetivo la búsqueda de una estrategia terapéutica eficaz que por una parte, provoque una aceleración en el proceso de reparación muscular, y por otra, una mejoría en la calidad del tejido muscular regenerado [7-8,169,220].

Las plaquetas contienen en su interior multitud de factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas, que de manera fisiológica juegan un papel fundamental en la modulación de las diferentes fases del proceso de cicatrización muscular [7,40,220]. Consecuentemente, se han llevado a cabo multitud de estudios experimentales y clínicos, donde se emplean diversos tipos de PRP, entre los que se encuentra el PRGF, con el objetivo de evaluar el posible efecto beneficioso de la terapia sobre el proceso de reparación muscular [38,63,94,96,161,174,212].

El PRGF, como un tipo particular de PRP, ha sido utilizado con éxito en el escenario clínico para el tratamiento de una rotura muscular en deportistas profesionales [161,221]. La recuperación funcional de los deportistas que se beneficiaron de esta terapia, tuvo lugar en la mitad de tiempo que fue necesario en los pacientes que no recibieron PRGF [221]. Por otro lado, no se describió la presencia de fibrosis a nivel ecográfico, y no se tiene constancia de aparición de lesiones recidivantes en los atletas después de la vuelta a la actividad deportiva [221]. Loo et al. [161] registró el seguimiento de un caso clínico de rotura del músculo aductor largo, que fue tratado con tres infiltraciones seriadas de PRGF, con un intervalo de una semana entre tratamientos. La vuelta a la actividad deportiva del individuo tuvo lugar tan sólo una semana después de la última infiltración, sin aparición de complicaciones asociadas a la terapia [161].

Según lo descrito hasta la actualidad, no existe ningún estudio experimental en el que se valore el efecto histopatológico y bioquímico del PRGF sobre la reparación muscular de una rotura de grado II en el bíceps femoral. Por ello nos planteamos la realización del segundo estudio que forma parte de la presente tesis doctoral.

9.2- Evaluación histopatológica y bioquímica del efecto del PRGF sobre la reparación muscular tras una rotura de grado II en el bíceps femoral

Cuando se produce una rotura de fibras musculares, tiene lugar una respuesta inflamatoria durante los primeros días de la fase inicial de cicatrización, que será de vital importancia para que se produzca una correcta regeneración muscular [35,237]. Se ha descrito que la inhibición de la enzima COX-2, fenómeno que se produce con el uso de la gran mayoría de los anti-inflamatorios no esteroideos en la práctica clínica, disminuiría la síntesis de ciertas prostaglandinas que son esenciales para que se culmine una regeneración muscular adecuada [35,237]. Está ampliamente descrito el papel activo que desempeñan ciertos factores de crecimiento contenidos en el PRP, sobre la modulación y resolución de la respuesta inflamatoria, y consecuentemente produciendo un acortamiento en el proceso de regeneración muscular [30,54,220]. En el segundo estudio de la presente tesis doctoral, se describió a nivel histológico una ausencia de infiltrado celular inflamatorio en el músculo esquelético normal intacto. Por el contrario, se mostró un incremento significativo en la densidad de células inflamatorias en todos los músculos que fueron dañados quirúrgicamente. El grupo de músculos que fueron infiltrados con PRGF, presentaron una menor densidad celular inflamatoria estadísticamente significativa, en comparación con los músculos del grupo Salino, a lo largo de todo el período de estudio. Este hallazgo histopatológico sugiere un efecto anti-inflamatorio asociado a la terapia con PRGF en una lesión muscular de grado II, desde la primera semana del proceso de regeneración tisular. En contraposición a nuestros resultados, Borrión et al. [39] registraron una magnificación de la respuesta inflamatoria a los 2 y 5 días en el grupo de músculos dañados quirúrgicamente que habían sido tratados con PRP, en comparación con los músculos pertenecientes al grupo control, que no recibieron ningún tratamiento. En esta misma línea, Delos et al. [63] describieron una ausencia de efecto de la terapia con PRP sobre la respuesta inflamatoria a 1, 4, 7, 10 y 14 días de producirse una contusión muscular. En ambos estudios experimentales, la composición del PRP utilizado contenía una concentración plaquetaria mayor al cuádruple de la descrita en sangre circulante de los animales. En este sentido, se ha descrito que la presencia de elevadas concentraciones de plaquetas en el PRP, y consecuentemente un desequilibrio en la concentración de ciertas moléculas que participan en el proceso de cicatrización muscular, pueden desencadenar efectos no deseados sobre el proceso de regeneración tisular [41,152,159]. Adicionalmente, en el trabajo experimental sobre el estudio del efecto del PRP en la reparación tisular tras

producirse una contusión muscular [63], los autores emplearon un tipo de PRP en el cual se incluye la capa leucocitaria, y por lo tanto, con una elevada concentración de esta población de células sanguíneas. La presencia de elevadas concentraciones de glóbulos blancos en el PRP pueden enmascarar los efectos beneficiosos que los factores de crecimiento presentan sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en el tejido, debido a una alteración en su forma de liberación en el punto lesional, así como por un aumento en la dosis de citoquinas pro-inflamatorias liberadas junto con el resto de componentes del PRP [23,202,251]. A este respecto, como se describió previamente, el PRGF es un tipo particular de PRP que no contiene leucocitos en su composición [11].

En una rotura muscular de grado II, se produce un estímulo angiogénico en el foco lesionado, con el objetivo de proveer al tejido en regeneración de oxígeno, otros nutrientes y células derivadas de la sangre, además de retirar los desechos productos del metabolismo celular [119]. En el presente estudio, el músculo esquelético normal mostró una densidad vascular moderada, con capilares que presentaban un área de sección transversal pequeña, y distribuidos de forma homogénea en el tejido muscular. Tras producirse de forma quirúrgica la lesión muscular de grado II, se observó un incremento en ambas variables histológicas que determinan la respuesta vascular del tejido, densidad y área vascular. En el grupo de músculos infiltrados con solución salina se mostraron vasos sanguíneos de mayor calibre que en el grupo PRGF, durante las primeras dos semanas de estudio. Además, el grupo Salino mostró a nivel histológico una mayor densidad vascular que en el grupo PRGF, estadísticamente significativa a las 4 semanas de estudio. Este hallazgo histológico sugiere que el PRGF participa en la modulación de los fenómenos de neovascularización del tejido muscular tras producirse un daño agudo. Esta terapia autóloga da lugar a vasos sanguíneos de un menor calibre, y con una menor densidad vascular. Consecuentemente, el empleo de PRGF desencadena la formación de un tejido muscular con una mayor madurez cicatricial, similar al músculo esquelético normal en la especie ovina, al contrario que en los músculos infiltrados con solución salina.

El músculo esquelético presenta una capacidad de regeneración autónoma a partir de una población de células indiferenciadas, denominadas células satélite, que se localizan debajo de la membrana basal de las fibras musculares, en estado quiescente, y preparadas para su activación cuando se produce un daño muscular [119]. Se describen varios FRM, entre los que destacan MyoD1, Myf5 y Myog, como marcadores

proteínicos celulares, que se expresan de forma cronológica en diferentes tiempos durante el proceso de cicatrización muscular [71,111,241,269]. Por otro lado, se describe la Mstn como un factor regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético, que pertenece a la superfamilia TGF- β [142]. La determinación de los niveles de expresión para los genes mencionados anteriormente, se llevó a cabo mediante el estudio bioquímico por RT-Q-PCR. En lo referente a MyoD1, cuando se realizó la comparación de los grupos PRGF y Salino a los diferentes tiempos de estudio, se registró una tendencia muy clara a favor del grupo PRGF, describiéndose valores de expresión superiores a los que se mostraban en los músculos infiltrados con solución salina. Esto puede ser sugerente de que el PRGF produce una mayor activación de las células satélite, para que se produzca por una parte un aumento en su multiplicación, y por otra, una mayor diferenciación hacia mioblastos y miocitos, que son las células que constituyen la estructura del músculo esquelético maduro. En la comparación entre los grupos PRGF y Salino a los diferentes tiempos de estudio, respecto a los niveles de expresión de MyoD1, Myf5, Myog y Mstn, se describió una ausencia de diferencias detectables desde un punto de vista estadístico. Una posible hipótesis que explicaría este resultado estadístico, puede estar debido a que se tratan de genes que se activan y participan en los mecanismos bioquímicos y moleculares de reparación de las fibras musculares dañadas desde estadios de cicatrización muscular previo a las 72 horas después de producirse la rotura fibrilar [241]. Además, estudios experimentales previos han demostrado la precocidad del efecto del PRP sobre la activación de estos marcadores bioquímicos como indicadores de regeneración muscular [39,67]. En esta línea, Borrión et al. [39] realizaron un estudio IHQ para la determinación de MyoD en estadios muy tempranos de cicatrización muscular previo a una semana. Los resultados mostraron que el PRP provocó una mayor expresión de MyoD sólo a los 2 y 5 días de producirse un daño muscular en un modelo animal llevado a cabo en ratas [39]. Además, Dimauro et al. [67] realizaron la determinación de ARNm de los FRM MyoD1 y Myf5 en un estadio precoz de cicatrización muscular, en un modelo animal de laceración muscular quirúrgica en ratas. Los resultados mostraron que el PRP provocaba un incremento significativo de los niveles de expresión de MyoD1 sólo a los 2 días, y un incremento en la expresión de Myf5 sólo a los 5 días [67]. Ante esta situación, sería recomendable para un estudio futuro, llevar a cabo la evaluación bioquímica en un estadio de cicatrización muscular más temprano de una semana. De este modo, cabría la posibilidad de confirmar que el PRGF produce una activación de las células satélite más

temprana y de mayor intensidad, y como consecuencia, se produce una aceleración en el proceso de reparación muscular, como se ha demostrado en los resultados de las variables histológicas estudiadas en el presente estudio.

La determinación del porcentaje de FNC se ha utilizado en diversos estudios como criterio histológico para evaluar el grado de regeneración muscular [54,63,96,119,247]. En el músculo esquelético intacto de las ovejas que participaron en el presente estudio experimental, se describió a la totalidad de las fibras musculares con el núcleo ubicado en situación periférica. Al producirse un daño quirúrgico, se registró un incremento en el porcentaje de FNC en ambos grupos PRGF y Salino, que se mantuvo a lo largo de todo el período de estudio. Al comparar el grupo de músculos tratados con PRGF, con aquellos que fueron infiltrados con solución salina, se registró un mayor porcentaje de FNC estadísticamente significativo en los músculos del grupo PRGF, que se mantuvo desde la primera semana hasta el final del período de estudio. Este hallazgo histológico es indicativo de que la terapia con PRGF produjo un aumento en la intensidad de regeneración muscular, y previsiblemente, una aceleración en el proceso de reparación muscular. En concordancia con los resultados obtenidos en el presente experimento, estudios previos han demostrado que el uso de PRP aumentó de forma significativa el porcentaje de FNC, en comparación con el grupo control [96,247]. De este modo, se confirma el efecto beneficioso de ciertos factores de crecimiento contenidos en el PRP, sobre la regeneración muscular. Por lo tanto, cabría esperar que con el uso de PRGF para el tratamiento de una lesión muscular de grado II, se produciría un acortamiento del período de convalecencia del individuo, con una vuelta a la actividad deportiva más temprana, que con el tratamiento convencional llevado a cabo en este tipo de lesiones.

Con el proceso de reparación de una rotura muscular de grado II, el hueco creado entre ambos muñones de las fibras musculares es ocupado por tejido conectivo [119]. La formación de tejido conectivo mantenida en el tiempo como cicatriz de fibrosis en el foco de la lesión, se considera uno de los hallazgos patológicos más importantes en el proceso de cicatrización muscular [107]. Hasta la actualidad, se sabe que tras la recuperación clínica completa de una rotura muscular de grado II, queda un remanente de tejido fibrótico en la zona de la lesión, a pesar de la terapia utilizada en el manejo de esta patología [107]. En este sentido, con el objetivo de reducir la cicatriz de fibrosis, y consecuentemente el número de recidivas tras la recuperación, se necesitan

nuevas estrategias de manejo de una rotura muscular de grado II. En el presente estudio experimental en la especie ovina, la tinción TM de los músculos esqueléticos sanos, mostraron una ausencia de acúmulo de tejido conectivo patológico entre las fibras musculares. Por el contrario, los músculos dañados quirúrgicamente, independientemente del tratamiento recibido, mostraron la presencia de tejido conectivo entre las fibras musculares rotas. En ambos grupos PRGF y Salino, se produjo un incremento en el área de fibrosis a las 2 semanas de cicatrización, con una disminución hacia el final del periodo de estudio. Los músculos que pertenecen al grupo PRGF presentaron un área de fibrosis significativamente menor que aquellos que fueron infiltrados con solución salina, en todos los tiempos de evaluación a 1, 2 y 4 semanas. En contraposición a nuestros resultados, Cunha et al. [51] registraron que los músculos tratados con PRP presentaron el mismo porcentaje de colágeno tipo I y colágeno tipo III, que aquellos que no recibieron esta terapia. Por otro lado, Delos et al. [63] determinaron la extensión del área de fibrosis en el músculo en regeneración tras una contusión muscular, registrando una ausencia de efecto de la terapia con PRP, en comparación con el grupo control. Una vez más, se considera de vital importancia la composición del PRP utilizado en estos trabajos experimentales. A este respecto, la concentración plaquetaria contenida en el PRP fue superior a 4 veces la que se describe en la sangre circulante del animal. El TGF- β 1 es un factor de crecimiento contenido en el interior de las plaquetas, que se encarga de desencadenar el inicio de la producción de proteínas ligadas a la fibrosis, así como de inhibir la producción de ciertas proteínas miogénicas [153,231]. Varios estudios han demostrado que mediante la adición de anticuerpos neutralizantes del TGF- β 1, o con el uso de un agente anti-fibrosis, ambos en combinación con PRP, se previene la formación de tejido fibrótico, con una mejoría en la recuperación de la fuerza del músculo dañado, y un aumento en la intensidad de regeneración muscular [81,152,247]. Al contrario que los tipos de PRP utilizados en los estudios previos, el PRGF es un tipo particular de PRP que contiene una concentración plaquetaria moderada, de 2-3 veces superior a la sangre circulante del propio paciente [14,220]. Teniendo en consideración el papel que el TGF- β 1 tiene sobre la regeneración muscular, puede ser sugestivo de que una concentración elevada de este factor, puede enmascarar los efectos beneficiosos de otros factores de crecimiento y proteínas biológicamente activas contenidas en el PRP. Consecuentemente, este hecho no sólo puede dar lugar a una mayor cantidad de fibrosis en el tejido muscular neoformado, sino también provocar un enlentecimiento en el proceso de regeneración muscular.

El estudio descriptivo de la ultra-estructura muscular fue llevado a cabo con el uso del microscopio electrónico de transmisión. La organización estructural observada en ambos grupos PRGF y Salino, se asocia con una reacción hipertrófica propia de un estímulo regenerativo tras producirse un daño muscular, en la cual tiene lugar la activación, división y diferenciación de las células satélite para regenerar la zona muscular afectada [74]. Durante las primeras dos semanas de estudio, los músculos infiltrados con solución salina mostraron un edema difuso, con los túbulos T del retículo endoplásmico dilatados, así como una gran desorganización en la arquitectura del tejido conectivo. Sin embargo, los músculos del grupo PRGF mostraron una menor cantidad de edema tisular, y una pérdida moderada de la arquitectura del tejido conectivo. En este sentido, existe una correlación entre los resultados observados en microscopía electrónica, y los hallazgos histológicos descritos en microscopía óptica, entre los cuales se registra un menor infiltrado celular inflamatorio en el grupo PRGF. En consecuencia, se confirma nuevamente el efecto anti-inflamatorio y de modulación de la homeostasis tisular asociado a la terapia con PRGF, previamente descrito en otros tejidos, y en el primer estudio sobre el tendón de Aquiles en la presente tesis doctoral [22,76]. A las 4 semanas del inicio del experimento, los músculos del grupo PRGF mostraron unas fibrillas musculares menos onduladas que aquellas del grupo Salino. Este hallazgo estructural es indicativo de que se está llevando a cabo un proceso de regeneración fisiológico y controlado [74]. Por otro lado, los músculos infiltrados con PRGF presentaron una mayor densidad de mitocondrias, localizadas estratégicamente adjuntas a la banda “Z” del sarcómero, tal y como se localizan de manera fisiológica en el músculo esquelético intacto [74]. Por el contrario, los músculos del grupo Salino mostraron no sólo una menor densidad de mitocondrias, sino también una distribución de forma aleatoria en el tejido. Las mitocondrias son organelas que se encargan de llevar a cabo el metabolismo oxidativo, constituyendo la principal ruta de obtención de energía en las fibras musculares maduras, para que se lleve a cabo la contracción muscular [24,119]. La menor densidad mitocondrial, junto con una distribución patológica de estos orgánulos en los músculos infiltrados con solución salina, pueden ser motivo de una menor eficiencia de suministro de energía a nivel metabólico, tan importante desde el punto de vista de recuperación funcional en el músculo lesionado. Por lo tanto, los hallazgos descritos en la ultraestructura sugieren que los músculos inyectados con PRGF presentaban un mayor ritmo metabólico, que a su vez provocaría una mayor aceleración en el proceso de regeneración muscular, en comparación con los

músculos inyectados con solución salina. En esta misma línea, Martins et al. [174] demostraron que la terapia con PRP utilizada en un daño muscular, provocaba una modulación del daño tisular a través del metabolismo mitocondrial, y una mejoría en el sistema antioxidante endógeno, con lo cual se promueve una reparación muscular más rápida y de mejor calidad. De esta forma, se demuestra el efecto positivo que presentan la multitud de factores de crecimiento y otras proteínas bioactivas alojadas en el PRP, sobre la recuperación metabólica y de la homeostasis fisiológica que el tejido muscular presentaba previo a la lesión, y que son fundamentales para que se lleve a cabo una contracción muscular eficiente [74].

9.3- Comparación de nuestros resultados experimentales con los estudios clínicos que emplean PRP en el tratamiento de una rotura muscular de grado II

Se han registrado diversos estudios donde se evalúa el efecto clínico del tratamiento con diferentes tipos de PRP para el manejo de una rotura muscular de grado II [32,44,94,161,191,210-212,214,221,263,270]. En todos los casos, se plantea como un doble objetivo de acelerar el proceso de regeneración muscular, y de mejorar la calidad del tejido neoformado, para disminuir la incidencia de aparición de lesiones recidivantes. Tanto el protocolo utilizado para la obtención del PRP, y en consecuencia la composición del mismo, así como el método utilizado para evaluar la eficacia clínica de la terapia sobre la regeneración muscular, son enormemente diferentes cuando comparamos unos estudios con otros. Ante esta situación, es esperable que los resultados clínicos del uso de PRP, en su amplio e inespecífico concepto, sobre la cicatrización de una lesión muscular de grado II, sean extremadamente variables y no consistentes.

Se han asociado diversos efectos beneficiosos de la terapia con PRP para el manejo clínico de una lesión muscular de grado II, entre los que se destacan: una disminución del dolor en la zona de la lesión, una mayor regeneración muscular diagnosticada por ecografía y por RM, una recuperación más rápida de la fuerza y rango de movilidad de la extremidad afectada, y consiguientemente una vuelta a la actividad deportiva más temprana que en los pacientes que recibieron una terapia convencional [44,191,214,270]. Por el contrario, existen otros estudios que demuestran una ausencia

de efecto clínico beneficioso en el uso de PRP para el tratamiento de una rotura muscular de grado II [94,210]. En este sentido, Hamilton et al. [94] evaluaron la eficacia de la aplicación de PRP en el tratamiento de una lesión muscular de grado II. Los autores valoraron el tiempo necesario para que los atletas volvieran al nivel de actividad deportiva que tenían previo a la lesión, así como la calidad de cicatrización muscular a través de una evaluación por RM. Los resultados de la aplicación de una sola dosis de PRP para el tratamiento de la rotura muscular mostraron una ausencia de efectos beneficiosos, en comparación con los pacientes que siguieron sólo y exclusivamente un programa de rehabilitación [94]. En esta misma línea, Rettig et al. [210] compararon la evolución clínica de dos grupos de pacientes que habían sufrido en ambos casos una rotura muscular de grado II. Un grupo de deportistas se benefició de la terapia con PRP junto con un protocolo de rehabilitación, y el otro grupo siguió solamente un protocolo de rehabilitación. Los resultados mostraron que una sola aplicación de PRP en la lesión muscular de grado II, no provocó una reducción en el tiempo necesario para la vuelta a la actividad deportiva. Ante estos resultados, los dos estudios clínicos concluyeron que la terapia con PRP para el manejo de una lesión muscular de grado II, carece de un efecto clínico beneficioso, en comparación con la terapia convencional junto con un protocolo de rehabilitación [94,210]. Es imprescindible resaltar que la composición del PRP utilizado incluía una concentración plaquetaria de 4-9 veces superior a la descrita en la sangre circulante del propio paciente. Además, el PRP incluía una concentración de leucocitos de 5 veces superior a la sangre circulante. Una excesiva concentración plaquetaria, y consecuentemente una concentración desproporcionada de ciertos factores de crecimiento (TGF- β 1), se han asociado a la formación de tejido muscular con presencia de un mayor tejido fibrótico [81,152,247]. Por otro lado, los leucocitos incluidos en el PRP, promueven los fenómenos inflamatorios, y son ricos en metaloproteasas que destruyen ciertos factores de crecimiento, alterando la dinámica de actuación y liberación de los mismos [21,23,202,251]. En ambos estudios, llevan a cabo una sola aplicación de PRP para estimular el proceso de cicatrización muscular [94,210]. Por el contrario, el experimento realizado en el modelo animal de rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina en la presente tesis doctoral, se realizaron 3 infiltraciones intralesionales seriadas, de forma ecoguiada, con un intervalo entre tratamientos de una semana. Siguiendo esta metodología, se reproduce un estímulo suprafisiológico moderado, y mantenido a lo largo del proceso de regeneración muscular. Por último, en lo referido a los estudios clínicos previos en los

que no se ha descrito un efecto beneficioso del uso de PRP como tratamiento de una rotura muscular de grado II, en ambos casos no realizan una activación del PRP previo a su inyección intralesional [94,210]. Por el contrario, la aplicación de PRGF en el modelo animal del segundo estudio de la presente tesis doctoral, se llevó a cabo mediante su inyección intralesional en fase líquida, de forma ecoguiada, y tras su activación con cloruro de calcio. Con esta metodología de aplicación, se ha demostrado que se consigue de una manera más precisa, el control de la liberación de la dosis terapéutica de factores de crecimiento sobre la zona lesionada dónde se deposita, y que resulta de interés para el clínico [21].

En el escenario clínico, se ha utilizado el PRGF con éxito para el tratamiento de una lesión muscular de grado II [161,221]. En ambos casos, se realizaron infiltraciones seriadas de PRGF aplicado intralesional y de forma ecoguiada, al igual que se ha llevado a cabo en el estudio de la presente tesis doctoral. Los pacientes que se beneficiaron de la terapia con PRGF, mostraron una disminución del dolor en la zona afectada, asociado a una menor inflamación de los tejidos, con una vuelta a la actividad deportiva a nivel competitivo en un tiempo inferior a lo esperado con una terapia convencional [161,221]. De esta manera, se demuestran a nivel clínico los efectos del PRGF que han sido descritos a nivel experimental en el segundo estudio de la presente tesis doctoral. Estos son: efecto anti-inflamatorio y una aceleración en el proceso de regeneración muscular, que daría lugar a una vuelta a la actividad deportiva más temprana. De este modo, la aplicación repetida de PRGF, con una composición libre de leucocitos y una concentración moderada de plaquetas, induce un estímulo suprafisiológico moderado y mantenido en el tiempo sobre las diferentes fases del proceso de cicatrización muscular, resultando en un acortamiento en el periodo de convalecencia del paciente, y una mejor calidad en el tejido regenerado.

9.4- Limitaciones del estudio

Se pueden considerar dos limitaciones en el segundo estudio experimental de la presente tesis doctoral:

- 1- El experimento incluye el análisis histológico y bioquímico del proceso de cicatrización muscular a 1, 2 y 4 semanas de producirse una rotura muscular de grado II. Desde un punto de vista bioquímico y molecular, los

mecanismos de activación y diferenciación en el proceso de regeneración muscular se producen de forma natural durante las primeras 72 horas tras producirse el daño tisular [241]. Es por ello por lo que se recomienda en estudios futuros la evaluación de una fase de cicatrización muscular previo a una semana, con el objetivo de tratar de elucidar el mecanismo bioquímico por el cual el PRGF produce una mayor regeneración muscular en estadios de cicatrización posteriores, y consecuentemente, un acortamiento en el tiempo necesario para la vuelta a la actividad física del paciente tras producirse una rotura muscular de grado II.

- 2- No se ha llevado a cabo un estudio de funcionalidad en el que se evalúe la repercusión del PRGF sobre la recuperación de las propiedades fisiológicas funcionales que el músculo bíceps femoral presentaba previo a la rotura de grado II. La especie ovina pertenece al colectivo de animales que se comportan como presa en su ecosistema natural. Esto implica que el animal no manifiesta dolor y grado de cojera de la misma forma que tiene lugar en la especie humana. Por lo tanto, las escalas de valoración analógica diseñadas para estimar la recuperación funcional de la lesión, no son válidas en la oveja. Ante esta situación, sería recomendable en estudios futuros el uso de una técnica de valoración funcional como la tensiomiografía, en la que se realiza una evaluación de la funcionalidad muscular de forma objetiva, con el animal inmovilizado y sin la influencia del comportamiento del individuo [256].

X. Conclusiones / Conclusions

ESTUDIO 1

- 1- El PRGF no indujo cambios remarcables sobre la morfometría del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, densidad y diámetro de los capilares sanguíneos, y la matriz extracelular, en comparación con el grupo Salino, a las dos semanas de una rotura aguda completa en el tendón de Aquiles de la especie ovina.
- 2- El PRGF produjo una disminución significativa en el infiltrado de células inflamatorias, en comparación con el grupo Salino, a las dos semanas de una rotura aguda completa en el tendón de Aquiles de la especie ovina. De esta manera, el PRGF produce un efecto anti-inflamatorio sobre un estadio temprano de cicatrización tendinosa.

ESTUDIO 2

- 1- El modelo animal de rotura muscular de grado II de forma ecoguiada del bíceps femoral en la especie ovina, es una técnica segura y reproduce una lesión homogénea y repetible adecuada para evaluar el efecto del PRGF sobre la reparación muscular.
- 2- El PRGF produjo una disminución significativa en el infiltrado de células inflamatorias, en comparación con el grupo Salino, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina. De esta manera, el PRGF produce un efecto anti-inflamatorio sobre el proceso de regeneración muscular.
- 3- El PRGF dio lugar a la formación de vasos sanguíneos de menor tamaño, y a una menor densidad vascular a lo largo del proceso de regeneración muscular, en comparación con el grupo Salino, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina. De esta manera, el PRGF produce una modulación de la respuesta vascular en el tejido muscular en regeneración.

- 4- El PRGF desencadenó la aparición de un mayor porcentaje de FNC en el tejido muscular en regeneración, en comparación con el grupo Salino, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina. De esta manera, el PRGF provoca una mayor intensidad de regeneración muscular.
- 5- El PRGF produjo una disminución en el porcentaje de área de fibrosis en el tejido en regeneración, en comparación con los músculos infiltrados con solución salina, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina. De esta manera, el PRGF produjo una mejor calidad en el tejido muscular regenerado.
- 6- El PRGF no indujo cambios remarcables respecto al nivel de expresión de MyoD1, Myf5, Myog y Mstn, en comparación con los músculos infiltrados con solución salina, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina.
- 7- El PRGF dio lugar a una mayor densidad de mitocondrias asociadas a la banda “Z” del sarcómero, en comparación con los músculos infiltrados con solución salina, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina. Esto puede ser sugestivo de que el PRGF produce una recuperación más temprana de la homeostasis y el metabolismo aeróbico en el tejido muscular regenerado.

EXPERIMENT 1

- 1- PRGF did not lead remarkable changes on the morphometric data of fibroblast nuclei, fibroblast density, density and diameter of the blood vessels, and extracellular matrix, in comparison with the Saline group, at two weeks of an acute complete Achilles tendon rupture in ovine.
- 2- PRGF leaded significant decrease of inflammatory cells infiltration, in comparison with the Saline group, at two weeks of an acute complete Achilles tendon rupture in ovine. Therefore, PRGF induces an anti-inflammatory effect on early stage of Achilles tendon healing.

EXPERIMENT 2

- 1- The animal model of grade II muscle rupture on the femoral biceps under ultrasound guidance in ovine is a safe technique, which reproduces homogeneous and repeatable lesions that are suitable to evaluate the effect of PRGF on muscle regeneration process.
- 2- PRGF leaded a significant decrease of inflammatory cells infiltration, in comparison with the Saline group, after a grade II muscle injury on the femoral biceps in ovine. Therefore, PRGF induces an anti-inflammatory effect on muscle healing process.
- 3- PRGF induced the formation of smaller blood vessels, and lower vascular density along the regeneration muscle process than the Saline group, after a grade II muscle injury on the femoral biceps in ovine. Therefore, PRGF plays a role on the modulation of the vascular response in the regenerating muscle tissue.
- 4- PRGF produced higher centrally nucleated fibers percentage in the regenerating muscle tissue, in comparison with the Saline group, after a grade II muscle injury on the femoral biceps in ovine. Therefore, PRGF induces a major muscle regeneration stimulus.

- 5- PRGF caused the formation of a lower fibrotic area percentage in the regenerating muscle tissue than the Saline group, after a grade II muscle injury on the femoral biceps in ovine. Therefore, PRGF induces the formation of a better quality regenerating muscle tissue.
- 6- PRGF did not lead remarkable changes regarding to the level of expression of MyoD1, Myf5, Myog and Mstn, in comparison with the Saline group, after a grade II muscle injury on the femoral biceps in ovine.
- 7- PRGF produced higher mitochondrias density associated to the “Z” band of the sarcomere, in comparison with the Saline group, after a grade II muscle injury on the femoral biceps in ovine. It may suggest that PRGF induces an earlier recovery of homeostasis as well as aerobic metabolism in the regenerating muscle tissue.

XI. Resumen / Summary

Las lesiones músculo-tendinosas han experimentado un incremento progresivo en su frecuencia de aparición a lo largo de los últimos años, dando lugar a una incapacidad de forma temporal o incluso permanente para realizar la actividad física diaria en el individuo afectado. La rotura aguda completa del tendón de Aquiles es una patología muy grave, cuyo tratamiento supone una decisión difícil debido al bajo potencial de cicatrización que presenta el tejido tendinoso. Por otro lado, la rotura muscular de grado II, especialmente afectando a la musculatura isquiotibial, se presenta de forma extremadamente frecuente en el mundo del deporte, provocando una interrupción de la actividad deportiva del individuo, y con un gran porcentaje de aparición de lesiones recidivantes.

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), es un tipo particular de Plasma Rico en Plaquetas (PRP), que ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de una rotura aguda completa del tendón de Aquiles en un escenario clínico y experimental. Sin embargo, no existe ningún registro bibliográfico donde se describa el efecto que produce el PRGF sobre un estadio temprano de cicatrización del tendón de Aquiles. Por otro lado, el PRGF ha sido utilizado con éxito en un escenario clínico para el tratamiento de una rotura muscular de grado II, provocando una disminución en el tiempo necesario para la vuelta a la actividad física del individuo afectado. Por el contrario, no se ha descrito desde un punto de vista experimental, el efecto que el PRGF provoca sobre el tejido muscular a lo largo del proceso de regeneración tras producirse una rotura de grado II. La aparición de resultados controvertidos descritos en algunos estudios, hacen que la comunidad científica mantenga un intenso debate acerca de la efectividad real que puede aportar la terapia con PRP en lesiones musculares y tendinosas. Los objetivos planteados para el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron: en el primer estudio experimental, llevar a cabo una evaluación histopatológica del efecto del PRGF sobre un estadio temprano de cicatrización del tendón de Aquiles; y en el segundo estudio experimental, realizar la evaluación histopatológica y bioquímica del efecto del PRGF sobre el proceso de regeneración muscular.

Para realizar el primer estudio experimental, se utilizaron 14 ovejas adultas sanas, que fueron divididas de forma aleatoria y al azar en dos grupos de 7 individuos cada uno: grupo PRGF y grupo Salino. En todos los individuos se reprodujo un modelo animal de rotura aguda completa del tendón de Aquiles de forma estandarizada. Se llevaron a cabo dos infiltraciones con PRGF o solución salina, una intraquirúrgica, y

otra una semana más tarde de forma ecoguiada. A las dos semanas de estudio, todos los animales fueron eutanasiados para llevar a cabo un estudio histopatológico del proceso de cicatrización tendinosa. Los resultados mostraron que los tendones del grupo PRGF presentaban un menor infiltrado celular inflamatorio que los del grupo Salino. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos PRGF y Salino respecto a la morfometría del núcleo de los fibroblastos, densidad de fibroblastos, los vasos sanguíneos, y en la matriz extracelular.

Para el desarrollo del segundo trabajo experimental, se utilizaron 21 ovejas adultas sanas, que fueron divididas de forma aleatoria y al azar en tres lotes de 7 individuos cada uno: T1, T2 y T4. Se realizó quirúrgicamente un modelo animal de rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de ambas extremidades del mismo individuo de forma estandarizada. Una extremidad fue tratada con PRGF (grupo PRGF), y la contralateral con solución salina (grupo Salino), en todos los casos de forma intralesional y ecoguiada. Todos los animales recibieron el primer tratamiento a los tres días de producirse el daño muscular, y hasta tres infiltraciones en total, con un intervalo de una semana entre tratamientos, dependiendo del tiempo de permanencia de cada lote en el estudio. Los animales de T1 fueron eutanasiados a 1 semana, los de T2 a las 2 semanas, y los de T4 a las 4 semanas del inicio del estudio, para llevar a cabo un estudio histopatológico y bioquímico del proceso de regeneración muscular. Los resultados mostraron que el grupo PRGF presentaba un menor infiltrado celular inflamatorio, presencia de vasos sanguíneos de menor tamaño, que disminuyeron en densidad con el transcurso del período de estudio, un mayor porcentaje de fibras musculares con el núcleo central, y un menor porcentaje de área de fibrosis, en comparación con los músculos del grupo Salino.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral sugieren: para el primer estudio experimental, que el PRGF provoca un efecto anti-inflamatorio en un estadio temprano de cicatrización tendinosa tras producirse una rotura aguda completa del tendón de Aquiles en la especie ovina; y para el segundo estudio experimental, que el PRGF provoca un efecto anti-inflamatorio, una aceleración en el proceso de regeneración muscular, con la producción de un tejido muscular de mayor madurez y calidad cicatricial, con menos cantidad de fibrosis, tras producirse una rotura muscular de grado II en el bíceps femoral de la especie ovina.

Muscle and tendon injuries are being registered with an increasing incidence during the last years. This type of lesions incapacitates people temporal or even permanently from doing daily physical activity. Acute complete Achilles tendon rupture is a severe tendon pathology. The election of a suitable treatment supposes a challenging decision due to the low potential healing associated to the tendinous tissue. Besides that, grade II muscle injuries, which the vast majority of the cases are described affecting the ischiotibialis muscles, are extremely often registered in sport, leading to the interruption of the physical activity, as well as high percentage of relapses.

Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) is a particular type of Platelet Rich Plasma (PRP), that has been successfully used for the treatment of acute complete Achilles tendon rupture, in both experimental and clinical scenario. However, the effect of PRGF on early stage of Achilles tendon healing has not been described. Furthermore, PRGF has been successfully used for the treatment of grade II muscle injury in clinical setting, leading to shorter time to return to play in sport. On the other side, experimental effect of PRGF on the regenerating muscle tissue has not been described after a grade II muscle rupture. Controversial results obtained in a few studies, make the scientific community to maintain an intense debate about the real clinical effect of PRP on muscular and tendinous injuries. The goals of the present doctoral thesis are: for the first experimental study, to perform histopathological evaluation of the effect of PRGF on early stage of Achilles tendon healing; for the second experimental study, to perform histopathological and biochemical evaluation of the effect of PRGF on muscle regeneration process.

With regard to the first study, 14 adult healthy sheep were used to carry out the experiment. The animals were randomly divided into two groups of 7 animals each one: PRGF group and Saline group. All the animals were operated in order to reproduce an animal model of standard acute complete Achilles tendon rupture. Two infiltrations of PRGF or saline solution were performed, one intraoperatively, and the other under ultrasound guidance one week later. At two weeks of study, all the animals were euthanized in order to carry out histopathological study of the tendon healing process. The results described that the tendons of PRGF group showed a significant decreased inflammatory cells infiltration, in comparison with the Saline group. No statistical significant differences regarding morphometric data of fibroblast nuclei, fibroblast

density, blood vessels, and extracellular matrix, were described between the PRGF and Saline groups.

With regard to the second study, 21 adult healthy sheep were used to perform the experiment. The animals were randomly divided into three sets of 7 animals each one: T1, T2 and T4. All the animals were operated in order to reproduce an animal model of standard grade II muscle injury on the femoral biceps of both hindlimb. One limb was treated with PRGF (PRGF group), and the contralateral one, with saline solution (Saline group). In both cases, the treatment was intralesionally injected under ultrasound guidance. All the animals received the first treatment three days after the surgery, as well as, up to three weekly infiltrations, depending on the time when each set of animals was euthanized. The animals belonging to T1, T2 and T4 were euthanized at 1, 2 and 4 weeks after the beginning of the study, respectively, in order to perform a histopathological and biochemical study of the muscle regeneration process. The results described that the PRGF group showed a significant decreased inflammatory cells infiltration, smaller blood vessels with a decreasing density of capillaries along the study, a higher percentage of centrally nucleated fibers, and a smaller fibrotic area, in comparison with the Saline group.

The results obtained in the present doctoral thesis suggest that: for the first experimental study, PRGF leads anti-inflammatory effect on early stage of tendon healing, after an acute complete Achilles tendon rupture in ovine; for the second experimental study, PRGF induces anti-inflammatory effect, acceleration of the muscular regeneration process, with production of a higher quality muscular tissue due to lower fibrotic area, after a grade II muscle rupture on the femoral biceps in ovine.

XII. Agradecimientos

XIII. Bibliografía

1. Ahmed IM, Lagopoulos M, McConnell P, Soames RW, Sefton GK (1998) Blood supply of the Achilles tendon. *J Orthop Res* 16:591-596.
2. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
3. Aktas S, Kocaoglu B (2009) Open versus minimal invasive repair with Achillon device. *Foot Ankle Int* 30:391-397.
4. Allahverdi A, Sharifi D, Takhtfooladi MA, Hesaraki S, Khansari M, Dorbeh SS (2015) Evaluation of low-level laser therapy, platelet-rich plasma, and their combination on the healing of Achilles tendon in rabbits. *Lasers Med Sci* 30:1305-1313.
5. Amiel D, Akeson WH, Harwood FL, Frank CB (1983) Stress deprivation effect on metabolic turnover of the medial collateral ligament collagen. A comparison between nine- and 12-week immobilization. *Clin Orthop Relat Res*:265-270.
6. Andia I, Sanchez M, Maffulli N (2010) Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther* 10:1415-1426.
7. Andia I, Abate M (2015) Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther* 15:987-999.
8. Andia I, Maffulli N (2015) Muscle and tendon injuries: the role of biological interventions to promote and assist healing and recovery. *Arthroscopy* 31:999-1015.
9. Andia I, Rubio-Azpeitia E, Maffulli N (2015) Platelet-rich plasma modulates the secretion of inflammatory/angiogenic proteins by inflamed tenocytes. *Clin Orthop Relat Res* 473:1624-1634.

10. Anitua E (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:529-535.
11. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91:4-15.
12. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT (2005) Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 23:281-286.
13. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I (2006) New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 24:227-234.
14. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zaldueño M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I (2006) Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A* 77:285-293.
15. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I (2008) Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 29:37-41.
16. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I (2009) Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J Biomed Mater Res A* 90:1262-1263.
17. Anitua E, Sanchez M, Zaldueño MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, Andia I (2009) Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif* 42:162-170.
18. Anitua E, Sanchez M, Orive G (2010) Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 62:741-752.

19. Anitua E, Sanchez M (2012) We cannot take oranges for apples in the field of platelet-rich plasma products. *Scand J Med Sci Sports* 22:147-148.
20. Anitua E, Sanchez M, De la Fuente M, Zalduendo MM, Orive G (2012) Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20:1657-1665.
21. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G (2013) Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat* 195:461-466.
22. Anitua E, Murias-Freijo A, Alkhraisat MH, Orive G (2015) Clinical, radiographical, and histological outcomes of plasma rich in growth factors in extraction socket: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig* 19:589-600.
23. Anitua E, Zalduendo MM, Prado R, Alkhraisat MH, Orive G (2015) Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J Biomed Mater Res A* 103:1011-1020.
24. Ashmore CR, Doerr L (1970) Oxidative metabolism in skeletal muscle of normal and dystrophic chicks. *Biochem Med* 4:246-259.
25. Aspenberg P, Virchenko O (2004) Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 75:93-99.
26. Barber FA, Hrnack SA, Snyder SJ, Hapa O (2011) Rotator cuff repair healing influenced by platelet-rich plasma construct augmentation. *Arthroscopy* 27:1029-1035.
27. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS (2000) Expression of CD34 and Myf5 defines the

- majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151:1221-1234.
28. Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, Desiderio MA (2010) Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF-kappaB inhibition via HGF. *J Cell Physiol* 225:757-766.
29. Bennett NT, Schultz GS (1993) Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 165:728-737.
30. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
31. Bernicker JP, Haddad JL, Lintner DM, DiLiberti TC, Bocell JR (1998) Patellar tendon defect during the first year after anterior cruciate ligament reconstruction: appearance on serial magnetic resonance imaging. *Arthroscopy* 14:804-809.
32. Bernuzzi G, Petraglia F, Pedrini MF, De Filippo M, Pogliacomi F, Verdano MA, Costantino C (2014) Use of platelet-rich plasma in the care of sports injuries: our experience with ultrasound-guided injection. *Blood Transfus* 12 Suppl 1:s229-234.
33. Birk DE, Zychband EI, Woodruff S, Winkelmann DA, Trelstad RL (1997) Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. *Dev Dyn* 208:291-298.
34. Bodin S, Soulet C, Tronchere H, Sie P, Gachet C, Plantavid M, Payrastre B (2005) Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci* 118:759-769.
35. Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK (2004) The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C475-483.

36. Border WA, Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292.
37. Borg TK, Caulfield JB (1980) Morphology of connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell* 12:197-207.
38. Borriore P, Gianfrancesco AD, Pereira MT, Pigozzi F (2010) Platelet-rich plasma in muscle healing. *Am J Phys Med Rehabil* 89:854-861.
39. Borriore P, Grasso L, Chierito E, Geuna S, Racca S, Abbadessa G, Ronchi G, Faiola F, Di Gianfrancesco A, Pigozzi F (2014) Experimental model for the study of the effects of platelet-rich plasma on the early phases of muscle healing. *Blood Transfus* 12 Suppl 1:s221-228.
40. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA (2012) Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 28:429-439.
41. Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA (2014) Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med* 42:42-49.
42. Boudreaux MK (2010) Platelet structure. In: KJ WDW (ed) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edn. Wiley-Blackwell, pp 561-568.
43. Boudreaux MK (2010) Thrombopoiesis. In: KJ WDW (ed) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edn. Wiley-Blackwell, pp 56-60.
44. Bubnov R, Yevseenko V, Semeniv I (2013) Ultrasound guided injections of platelets rich plasma for muscle injury in professional athletes. Comparative study. *Med Ultrason* 15:101-105.
45. Butler DL, Juncosa N, Dressler MR (2004) Functional efficacy of tendon repair processes. *Annu Rev Biomed Eng* 6:303-329.

46. Canalis E (1992) Clinical review 35: Growth factors and their potential clinical value. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1-4.
47. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL (2011) Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med* 39:266-271.
48. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122:289-301.
49. Creaney L, Hamilton B (2008) Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med* 42:314-320.
50. Crovace A, Lacitignola L, Francioso E, Rossi G (2008) Histology and immunohistochemistry study of ovine tendon grafted with cBMSCs and BMMNCs after collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 21:329-336.
51. Cunha RC, Francisco JC, Cardoso MA, Matos LF, Lino D, Simeoni RB, Pereira G, Irioda AC, Simeoni PR, Guarita-Souza LC, Carvalho KA (2014) Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. *Transplant Proc* 46:1879-1881.
52. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K (2000) Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand* 71:513-518.
53. Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, Huard J (2003) Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol* (1985) 95:771-780.
54. Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84:209-238.

55. Chen TM, Rozen WM, Pan WR, Ashton MW, Richardson MD, Taylor GI (2009) The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications. *Clin Anat* 22:377-385.
56. Christov C, Chretien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK (2007) Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell* 18:1397-1409.
57. Dakin SG, Dudhia J, Smith RK (2014) Resolving an inflammatory concept: the importance of inflammation and resolution in tendinopathy. *Vet Immunol Immunopathol* 158:121-127.
58. de Almeida AM, Demange MK, Sobrado MF, Rodrigues MB, Pedrinelli A, Hernandez AJ (2012) Patellar tendon healing with platelet-rich plasma: a prospective randomized controlled trial. *Am J Sports Med* 40:1282-1288.
59. De Carli A, Lanzetti RM, Ciompi A, Lupariello D, Vadala A, Argento G, Ferretti A, Vulpiani MC, Vetrano M (2016) Can platelet-rich plasma have a role in Achilles tendon surgical repair? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:2231-2237.
60. de la Durantaye M, Piette AB, van Rooijen N, Frenette J (2014) Macrophage depletion reduces cell proliferation and extracellular matrix accumulation but increases the ultimate tensile strength of injured Achilles tendons. *J Orthop Res* 32:279-285.
61. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ (2008) Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med* 36:1171-1178.
62. De Smet AA, Best TM (2000) MR imaging of the distribution and location of acute hamstring injuries in athletes. *AJR Am J Roentgenol* 174:393-399.

63. Delos D, Leineweber MJ, Chaudhury S, Alzoobaee S, Gao Y, Rodeo SA (2014) The effect of platelet-rich plasma on muscle contusion healing in a rat model. *Am J Sports Med* 42:2067-2074.
64. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS (2000) Lysosome-related organelles. *FASEB J* 14:1265-1278.
65. Denapoli PM, Stilhano RS, Ingham SJ, Han SW, Abdalla RJ (2016) Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing. *Am J Sports Med* 44:1962-1971.
66. Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG (1994) Differential effect of TGF-beta 1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 65:641-648.
67. Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, Fantini C, Mercatelli N, Racca S, Geuna S, Di Gianfrancesco A, Caporossi D, Pigozzi F, Borriore P (2014) Platelet-rich plasma and skeletal muscle healing: a molecular analysis of the early phases of the regeneration process in an experimental animal model. *PLoS One* 9:e102993.
68. Doral M, M B, Turhan E, Atay O, Dönmez G, Kaya D (2010) Functional anatomy of the achilles tendon. In: Calder J, Karlsson J, Maffulli N, Thermann H, Van Dijk C (eds) *Achilles Tendinopathy - Current concepts*. 1st edn. DJO publications, pp 9-14.
69. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, Turhan E, Atay OA, Donmez G, Maffulli N (2010) Functional anatomy of the Achilles tendon. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18:638-643.
70. Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegard JJ, Luong R, Arnoczky SP (2012) Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med* 40:1274-1281.

71. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA (2015) Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* 142:1572-1581.
72. Egger AC, Berkowitz MJ (2017) Achilles tendon injuries. *Curr Rev Musculoskelet Med* 10:72-80.
73. Ekstrand J, Hagglund M, Walden M (2011) Epidemiology of muscle injuries in professional football (soccer). *Am J Sports Med* 39:1226-1232.
74. Eurell J (2006) Muscle. In: Eurell J, Frappier B (eds) *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6th edn. Blackwell Publishing, pp 79-90.
75. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP (2002) The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res* 4:252-260.
76. Fernandez-Sarmiento JA, Dominguez JM, Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Gomez-Villamandos RJ, Munoz-Rascon P, Martin de Las Mulas J, Millan Y, Garcia-Balletbo M, Cugat R (2013) Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep. *J Bone Joint Surg Am* 95:246-255.
77. Ferreira SH, Nakamura M, de Abreu Castro MS (1978) The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 16:31-37.
78. Filardo G, Presti ML, Kon E, Marcacci M (2010) Nonoperative biological treatment approach for partial Achilles tendon lesion. *Orthopedics* 33:120-123.
79. Fioravanti C, Frustaci I, Armellini E, Condo R, Arcuri C, Cerroni L (2015) Autologous blood preparations rich in platelets, fibrin and growth factors. *Oral Implantol (Rome)* 8:96-113.
80. Fukasawa M, Bryant SM, Nakamura RM, diZerega GS (1987) Modulation of fibroblast proliferation by postsurgical macrophages. *J Surg Res* 43:513-520.

81. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J (2001) The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med* 29:394-402.
82. Ganestam A, Kallemose T, Troelsen A, Barfod KW (2016) Increasing incidence of acute Achilles tendon rupture and a noticeable decline in surgical treatment from 1994 to 2013. A nationwide registry study of 33,160 patients. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:3730-3737.
83. Garg K, Corona BT, Walters TJ (2015) Therapeutic strategies for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. *Front Pharmacol* 6:87.
84. Garrett WJ, Best T (1994) Anatomy, physiology, and mechanics of skeletal muscle. In: Simon S (ed) *Orthopaedic basic science*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, pp 89-125.
85. Geng Z, Wang C, Zhou H (2011) [Effect of platelet-rich plasma on tendon healing]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 25:344-348.
86. Gibson D, Angeles A, Hunt T (1997) Increased oxygen tension on wound metabolism and collagen synthesis. *Surg Forum* 48:696-699.
87. Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, Cianforlini M, Busilacchi A, Davidson PA, Greco F, Mattioli-Belmonte M (2012) Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. *J Biol Regul Homeost Agents* 26:475-484.
88. Giusti I, Rughetti A, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dell'Orso L, Dolo V (2009) Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion* 49:771-778.
89. Giusti I, D'Ascenzo S, Manco A, Di Stefano G, Di Francesco M, Rughetti A, Dal Mas A, Properzi G, Calvisi V, Dolo V (2014) Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior in vitro. *Biomed Res Int* 2014:630870.

90. Grageda E (2004) Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 13:301-309.
91. Grounds MD (1991) Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* 187:1-22.
92. Guelfi M, Pantalone A, Vanni D, Rosati D, Guelfi MG, Salini V (2014) Bilateral traumatic rupture of Achilles tendons in absence of risk factors treated with percutaneous technique and platelet-rich plasma: a case report. *Foot Ankle Surg* 20:e43-46.
93. Hagglund M, Walden M, Ekstrand J (2013) Risk factors for lower extremity muscle injury in professional soccer: the UEFA Injury Study. *Am J Sports Med* 41:327-335.
94. Hamilton B, Tol JL, Almusa E, Boukarroum S, Eirale C, Farooq A, Whiteley R, Chalabi H (2015) Platelet-rich plasma does not enhance return to play in hamstring injuries: a randomised controlled trial. *Br J Sports Med* 49:943-950.
95. Hamilton BH, Best TM (2011) Platelet-enriched plasma and muscle strain injuries: challenges imposed by the burden of proof. *Clin J Sport Med* 21:31-36.
96. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM (2009) Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med* 37:1135-1142.
97. Han B, Woodell-May J, Ponticiello M, Yang Z, Nimni M (2009) The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J Bone Joint Surg Am* 91:1459-1470.
98. Hannafin JA, Attia ET, Warren RF, Bhargava MM (1999) Characterization of chemotactic migration and growth kinetics of canine knee ligament fibroblasts. *J Orthop Res* 17:398-404.

99. Harrison S, Vavken P, Kevy S, Jacobson M, Zurakowski D, Murray MM (2011) Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med* 39:729-734.
100. Hartwig JH (2006) The platelet: form and function. *Semin Hematol* 43:S94-100.
101. Hernandez-Ruiz L, Valverde F, Jimenez-Nunez MD, Ocana E, Saez-Benito A, Rodriguez-Martorell J, Bohorquez JC, Serrano A, Ruiz FA (2007) Organellar proteomics of human platelet dense granules reveals that 14-3-3zeta is a granule protein related to atherosclerosis. *J Proteome Res* 6:4449-4457.
102. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 302 (Pt 2):527-534.
103. Hope M, Saxby TS (2007) Tendon healing. *Foot Ankle Clin* 12:553-567, v.
104. Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu C (2009) Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol* 28:324-335.
105. Houshian S, Tscherning T, Riegels-Nielsen P (1998) The epidemiology of Achilles tendon rupture in a Danish county. *Injury* 29:651-654.
106. Hsu C, Chang J (2004) Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am* 29:551-563.
107. Huard J, Li Y, Fu FH (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 84-A:822-832.
108. Hughston JC, Andrews JR, Cross MJ (1974) The injured knee. *J Med Assoc Ga* 63:362-368.

109. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Jarvinen M (1991) Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* 23:801-810.
110. Hurme T, Lehto M, Falck B, Tainio H, Kalimo H (1991) Electromyography and morphology during regeneration of muscle injury in rats. *Acta Physiol Scand* 142:443-456.
111. Hurme T, Kalimo H (1992) Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 24:197-205.
112. Iancu-Rubin C, Nasrallah CA, Atweh GF (2005) Stathmin prevents the transition from a normal to an endomitotic cell cycle during megakaryocytic differentiation. *Cell Cycle* 4:1774-1782.
113. Igotz RA, Massague J (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261:4337-4345.
114. Israels SJ, McMillan EM, Robertson C, Singhory S, McNicol A (1996) The lysosomal granule membrane protein, LAMP-2, is also present in platelet dense granule membranes. *Thromb Haemost* 75:623-629.
115. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB (2008) Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am* 33:102-112.
116. Jarvinen M (1976) Healing of a crush injury in rat striated muscle. 3. A micro-angiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 84:85-94.
117. Jarvinen M (1976) Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta Chir Scand* 142:47-56.

118. Jarvinen M, Sorvari T A histochemical study of the effect of mobilization and immobilization on the metabolism of healing muscle injury. In: Landry F (ed) Symposia Specialists, Miami, 1978. Orban WAR, pp 177-181.
119. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M (2005) Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 33:745-764.
120. Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM (2005) Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology. *Foot Ankle Clin* 10:255-266.
121. Jiang N, Wang B, Chen A, Dong F, Yu B (2012) Operative versus nonoperative treatment for acute Achilles tendon rupture: a meta-analysis based on current evidence. *Int Orthop* 36:765-773.
122. Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A (1991) Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)* 142:306-312.
123. Jozsa L, Kannus P (1997) Human tendons. *Anatomy, Physiology, and Pathology. Human Kinetics*:47-48; 54-55; 56-57; 59; 76-77; 80-81; 104.
124. Jozsa L, Kannus P (1997) Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports* 7:113-118.
125. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Jr., Shivdasani RA, von Andrian UH (2007) Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 317:1767-1770.
126. Kaariainen M, Kaariainen J, Jarvinen TL, Sievanen H, Kalimo H, Jarvinen M (1998) Correlation between biomechanical and structural changes during the regeneration of skeletal muscle after laceration injury. *J Orthop Res* 16:197-206.
127. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H (2000) Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* 10:332-337.

128. Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N (2002) Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med* 36:239-249.
129. Kahari VM, Larjava H, Uitto J (1991) Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 266:10608-10615.
130. Kajikawa Y, Morihara T, Sakamoto H, Matsuda K, Oshima Y, Yoshida A, Nagae M, Arai Y, Kawata M, Kubo T (2008) Platelet-rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol* 215:837-845.
131. Kaniki N, Willits K, Mohtadi NG, Fung V, Bryant D (2014) A retrospective comparative study with historical control to determine the effectiveness of platelet-rich plasma as part of nonoperative treatment of acute achilles tendon rupture. *Arthroscopy* 30:1139-1145.
132. Kannus P, Natri A (1997) Etiology and pathophysiology of tendon ruptures in sports. *Scand J Med Sci Sports* 7:107-112.
133. Kannus P, Jozsa L, Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kvist M, Natri A, Jarvinen M (1998) Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J* 30:799-810.
134. Kannus P (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10:312-320.
135. Kartus J, Lindahl S, Kohler K, Sernert N, Eriksson BI, Karlsson J (1999) Serial magnetic resonance imaging of the donor site after harvesting the central third of the patellar tendon. A prospective study of 37 patients after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 7:20-24.

136. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SS, Huard J (2000) Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res*:272-285.
137. Kaux JF, Drion PV, Colige A, Pascon F, Libertiaux V, Hoffmann A, Janssen L, Heyers A, Nusgens BV, Le Goff C, Gothot A, Cescotto S, Defraigne JO, Rickert M, Crielaard JM (2012) Effects of platelet-rich plasma (PRP) on the healing of Achilles tendons of rats. *Wound Repair Regen* 20:748-756.
138. Kelc R, Trapecar M, Gradisnik L, Rupnik MS, Vogrin M (2015) Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF-beta inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PLoS One* 10:e0117302.
139. Khan KM, Cook JL, Bonar F, Harcourt P, Astrom M (1999) Histopathology of common tendinopathies. Update and implications for clinical management. *Sports Med* 27:393-408.
140. King SM, Reed GL (2002) Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol* 13:293-302.
141. Kiritsy CP, Lynch AB, Lynch SE (1993) Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:729-760.
142. Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P, Bass J (2000) Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 184:356-363.
143. Koob TJ (2002) Biomimetic approaches to tendon repair. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133:1171-1192.
144. Kopydlowski N, Weber A, Sekiya J (2014) Functional anatomy of the hamstring and quadriceps. In: Kaeding C, Borchers J (eds) *Hamstring and Quadriceps Injuries in Athletes - A Clinical Guide*. 1st edn. Springer, New York, pp 1-14.

145. Kovacs T, Berger G, Corvazier E, Paszty K, Brown A, Bobe R, Papp B, Wuytack F, Cramer EM, Enouf J (1997) Immunolocalization of the multi-sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase system in human platelets. *Br J Haematol* 97:192-203.
146. Kuang S, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA (2007) Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129:999-1010.
147. Kurtz CA, Loebig TG, Anderson DD, DeMeo PJ, Campbell PG (1999) Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med* 27:363-369.
148. Lacoste E, Martineau I, Gagnon G (2003) Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol* 74:1498-1507.
149. Laiho M, Saksela O, Andreassen PA, Keski-Oja J (1986) Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 103:2403-2410.
150. Lane JG, Healey RM, Chase DC, Amiel D (2013) Use of platelet-rich plasma to enhance tendon function and cellularity. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 42:209-214.
151. Li H, Usas A, Poddar M, Chen CW, Thompson S, Ahani B, Cummins J, Lavasani M, Huard J (2013) Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One* 8:e64923.
152. Li H, Hicks JJ, Wang L, Oyster N, Philippon MJ, Hurwitz S, Hogan MV, Huard J (2016) Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor beta1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials* 87:147-156.

153. Li WQ, Qureshi HY, Liacini A, Dehnade F, Zafarullah M (2004) Transforming growth factor Beta1 induction of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 in articular chondrocytes is mediated by reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 37:196-207.
154. Li Y, Huard J (2002) Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol* 161:895-907.
155. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol* 164:1007-1019.
156. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ (2004) Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 37:865-877.
157. Lin TW, Cardenas L, Glaser DL, Soslowsky LJ (2006) Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech* 39:61-69.
158. Lind M (1996) Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 67:407-417.
159. Liu D, Black BL, Derynck R (2001) TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15:2950-2966.
160. Liu SH, Yang RS, al-Shaikh R, Lane JM (1995) Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res*:265-278.
161. Loo WL, Lee DY, Soon MY (2009) Plasma rich in growth factors to treat adductor longus tear. *Ann Acad Med Singapore* 38:733-734.
162. Lopez-Najera D, Rubio-Zaragoza M, Sopena-Juncosa JJ, Alentorn-Geli E, Cugat-Bertomeu R, Fernandez-Sarmiento JA, Dominguez-Perez JM, Garcia-Balletbo

- M, Primo-Capella VJ, Carrillo-Poveda JM (2016) Effects of plasma rich in growth factors (PRGF) on biomechanical properties of Achilles tendon repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 24:3997-4004.
163. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Pitiakoudis M, Kotzakarlis A (2009) The effect of platelet-rich plasma gel in the early phase of patellar tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 129:1577-1582.
 164. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Polychronidis A, Tryfonidis M, Botaitis S, Agrogiannis G, Simopoulos C, Kokka A, Patsouris E (2009) The influence of platelet-rich plasma on angiogenesis during the early phase of tendon healing. *Foot Ankle Int* 30:1101-1106.
 165. Lyras DN, Kazakos K, Agrogiannis G, Verettas D, Kokka A, Kiziridis G, Chronopoulos E, Tryfonidis M (2010) Experimental study of tendon healing early phase: is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel? *Orthop Traumatol Surg Res* 96:381-387.
 166. Lyras DN, Kazakos K, Georgiadis G, Mazis G, Middleton R, Richards S, O'Connor D, Agrogiannis G (2011) Does a single application of PRP alter the expression of IGF-I in the early phase of tendon healing? *J Foot Ankle Surg* 50:276-282.
 167. Maffulli N (1999) Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am* 81:1019-1036.
 168. Maffulli N, Moller HD, Evans CH (2002) Tendon healing: can it be optimised? *Br J Sports Med* 36:315-316.
 169. Maffulli N, Del Buono A, Oliva F, Giai Via A, Frizziero A, Barazzuol M, Brancaccio P, Freschi M, Galletti S, Lisitano G, Melegati G, Nanni G, Pasta G, Ramponi C, Rizzo D, Testa V, Valent A (2015) Muscle Injuries: A Brief Guide to Classification and Management. *Transl Med UniSa* 12:14-18.

170. Malliaropoulos N, Isinkaye T, Tsitas K, Maffulli N (2011) Reinjury after acute posterior thigh muscle injuries in elite track and field athletes. *Am J Sports Med* 39:304-310.
171. Manning CN, Kim HM, Sakiyama-Elbert S, Galatz LM, Havlioglu N, Thomopoulos S (2011) Sustained delivery of transforming growth factor beta three enhances tendon-to-bone healing in a rat model. *J Orthop Res* 29:1099-1105.
172. Manning CN, Havlioglu N, Knutsen E, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Thomopoulos S, Gelberman RH (2014) The early inflammatory response after flexor tendon healing: a gene expression and histological analysis. *J Orthop Res* 32:645-652.
173. Marsolais D, Cote CH, Frenette J (2001) Neutrophils and macrophages accumulate sequentially following Achilles tendon injury. *J Orthop Res* 19:1203-1209.
174. Martins RP, Hartmann DD, de Moraes JP, Soares FA, Puntel GO (2016) Platelet-rich plasma reduces the oxidative damage determined by a skeletal muscle contusion in rats. *Platelets* 27:784-790.
175. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:638-646.
176. Marx RE (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 10:225-228.
177. Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA (2007) Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 5:1945-1955.
178. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Dugdale EM, Hansen D, Cote MP, Bradley JP, Romeo AA, Arciero RA, Beitzel K (2012) The positive effects of

- different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells. *Am J Sports Med* 40:1742-1749.
179. McClure MJ, Garg K, Simpson DG, Ryan JJ, Sell SA, Bowlin GL, Ericksen JJ (2016) The influence of platelet-rich plasma on myogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med* 10:E239-249.
180. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162:1135-1147.
181. McNicol A, Israels SJ (1999) Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* 95:1-18.
182. Mei-Dan O, Lippi G, Sanchez M, Andia I, Maffulli N (2010) Autologous platelet-rich plasma: a revolution in soft tissue sports injury management? *Phys Sportsmed* 38:127-135.
183. Meisterling RC, Wadsworth T, Ardill R, Griffiths H, Lane-Larsen CL (1993) Morphologic changes in the human patellar tendon after bone-tendon-bone anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*:208-212.
184. Mendler L, Zador E, Ver Heyen M, Dux L, Wuytack F (2000) Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *J Muscle Res Cell Motil* 21:551-563.
185. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J (2000) Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 82:131-137.
186. Metzelaar MJ, Clevers HC (1992) Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost* 68:378-382.

187. Middleton KK, Barro V, Muller B, Terada S, Fu FH (2012) Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *Iowa Orthop J* 32:150-163.
188. Moller A, Astron M, Westlin N (1996) Increasing incidence of Achilles tendon rupture. *Acta Orthop Scand* 67:479-481.
189. Molloy T, Wang Y, Murrell G (2003) The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med* 33:381-394.
190. MS AH, Mohamed Ali MR, Yusof A, George J (2012) Platelet-rich plasma (PRP): an adjuvant to hasten hamstring muscle recovery. A randomized controlled trial protocol (ISCRTN66528592). *BMC Musculoskelet Disord* 13:138.
191. MS AH, Mohamed Ali MR, Yusof A, George J, Lee LP (2014) Platelet-rich plasma injections for the treatment of hamstring injuries: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med* 42:2410-2418.
192. Muller SA, Todorov A, Heisterbach PE, Martin I, Majewski M (2015) Tendon healing: an overview of physiology, biology, and pathology of tendon healing and systematic review of state of the art in tendon bioengineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 23:2097-2105.
193. Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R (2007) Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg* 31:808-816.
194. Nurden AT (2011) Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 105 Suppl 1:S13-33.
195. O'Brien M (1997) Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports* 7:55-61.

196. O'Brien M (2005) The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin* 10:225-238.
197. Oshiro W, Lou J, Xing X, Tu Y, Manske PR (2003) Flexor tendon healing in the rat: a histologic and gene expression study. *J Hand Surg Am* 28:814-823.
198. Parafioriti A, Armiraglio E, Del Bianco S, Tibalt E, Oliva F, Berardi AC (2011) Single injection of platelet-rich plasma in a rat Achilles tendon tear model. *Muscles Ligaments Tendons J* 1:41-47.
199. Pereira J, Soto M, Palomo I, Ocqueteau M, Coetzee LM, Astudillo S, Aranda E, Mezzano D (2002) Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost* 87:905-909.
200. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR (1994) Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 8:961-965.
201. Pinheiro CL, Peixinho CC, Esposito CC, Manso JE, Machado JC (2016) Ultrasound biomicroscopy and claudication test for in vivo follow-up of muscle repair enhancement based on platelet-rich plasma therapy in a rat model of gastrocnemius laceration. *Acta Cir Bras* 31:103-110.
202. Pizza FX, McLoughlin TJ, McGregor SJ, Calomeni EP, Gunning WT (2001) Neutrophils injure cultured skeletal myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C335-341.
203. Platt MA (2005) Tendon repair and healing. *Clin Podiatr Med Surg* 22:553-560, vi.
204. Quarteiro ML, Tognini JR, de Oliveira EL, Silveira I (2015) The effect of platelet-rich plasma on the repair of muscle injuries in rats. *Rev Bras Ortop* 50:586-595.

205. Rak J, Kerbel RS (1997) bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? *Nat Med* 3:1083-1084.
206. Rantanen J, Ranne J, Hurme T, Kalimo H (1995) Denervated segments of injured skeletal muscle fibers are reinnervated by newly formed neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:188-194.
207. Reed GL (2004) Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost* 30:441-450.
208. Reed GL (2007) Platelet secretion. In: Michelson AD (ed) *Platelet*. 2nd edn. Elsevier, pp 309-318.
209. Reiss RF, Katz AJ (1976) Optimizing recovery of platelets in platelet rich plasma by the simplex strategy. *Transfusion* 16:370-374.
210. Rettig AC, Meyer S, Bhadra AK (2013) Platelet-Rich Plasma in Addition to Rehabilitation for Acute Hamstring Injuries in NFL Players: Clinical Effects and Time to Return to Play. *Orthop J Sports Med* 1:2325967113494354.
211. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JA, Bierma-Zeinstra SM, Maas M, Tol JL (2014) Platelet-rich plasma injections in acute muscle injury. *N Engl J Med* 370:2546-2547.
212. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JA, Bierma-Zeinstra SM, Maas M, Tol JL (2015) Rationale, secondary outcome scores and 1-year follow-up of a randomised trial of platelet-rich plasma injections in acute hamstring muscle injury: the Dutch Hamstring Injection Therapy study. *Br J Sports Med* 49:1206-1212.
213. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2005) Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood* 106:4066-4075.

214. Rossi LA, Molina Romoli AR, Bertona Altieri BA, Burgos Flor JA, Scordo WE, Elizondo CM (2016) Does platelet-rich plasma decrease time to return to sports in acute muscle tear? A randomized controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*
215. Russell RP, Apostolakos J, Hirose T, Cote MP, Mazzocca AD (2013) Variability of platelet-rich plasma preparations. *Sports Med Arthrosc* 21:186-190.
216. Sabatini DD, Miller F, Barnett RJ (1964) Aldehyde Fixation for Morphological and Enzyme Histochemical Studies with the Electron Microscope. *J Histochem Cytochem* 12:57-71.
217. Sadoghi P, Lohberger B, Aigner B, Kaltenegger H, Friesenbichler J, Wolf M, Sununu T, Leithner A, Vavken P (2013) Effect of platelet-rich plasma on the biologic activity of the human rotator-cuff fibroblasts: A controlled in vitro study. *J Orthop Res* 31:1249-1253.
218. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I (2007) Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 35:245-251.
219. Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I (2009) Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* 39:345-354.
220. Sanchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Orive G, Padilla S (2014) Muscle repair: platelet-rich plasma derivatives as a bridge from spontaneity to intervention. *Injury* 45 Suppl 4:S7-14.
221. Sanchez M AE, Andia I (2005) Application of Autologous Growth Factors on Skeletal Muscle Healing. In: 2nd World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, May 18-20.
222. Scott A, Lian O, Bahr R, Hart DA, Duronio V (2008) VEGF expression in patellar tendinopathy: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 466:1598-1604.

223. Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P (2011) Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med* 39:38-47.
224. Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA (2007) Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 25:230-240.
225. Schulze H, Korpai M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T, Shivdasani RA (2006) Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood* 107:3868-3875.
226. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Jr., Hartwig JH, Shivdasani RA (2001) A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* 11:579-586.
227. Sehgal S, Storrie B (2007) Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost* 5:2009-2016.
228. Seijas R, Ares O, Catala J, Alvarez-Diaz P, Cusco X, Cugat R (2013) Magnetic resonance imaging evaluation of patellar tendon graft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction with or without platelet-rich plasma. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 21:10-14.
229. Seijas R, Rius M, Ares O, Garcia-Balletbo M, Serra I, Cugat R (2015) Healing of donor site in bone-tendon-bone ACL reconstruction accelerated with plasma rich in growth factors: a randomized clinical trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 23:991-997.
230. Sen B, Guler S, Cecen B, Kumtepe E, Bagriyanik A, Ozkal S, Ali Ozcan M, Ozsan H, Sanli N, Tatari MH (2016) The Effect of Autologous Platelet Rich Plasma in

- the Treatment of Achilles Tendon Ruptures: An Experimental Study on Rabbits. *Balkan Med J* 33:94-101.
231. Serrano AL, Mann CJ, Vidal B, Ardite E, Perdiguero E, Munoz-Canoves P (2011) Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr Top Dev Biol* 96:167-201.
232. Sharkey LC, Hill SA (2010) Structure of Bone Marrow. In: KJ WDW (ed) *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edn. Wiley-Blackwell, pp 8-13.
233. Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R (2001) Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev* 29:155-158.
234. Sharma P, Maffulli N (2005) Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87:187-202.
235. Sharma P, Maffulli N (2006) Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:181-190.
236. Sharma P, Maffulli N (2010) Achilles tendon structure and healing. In: Calder J, Karlsson J, Maffulli N, Thermann H, Van Dijk C (eds) *Achilles Tendinopathy - current concepts*. 1st edn. DJO Publications, pp 67-77.
237. Shen W, Prisk V, Li Y, Foster W, Huard J (2006) Inhibited skeletal muscle healing in cyclooxygenase-2 gene-deficient mice: the role of PGE2 and PGF2alpha. *J Appl Physiol* (1985) 101:1215-1221.
238. Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J (2008) Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *J Cell Physiol* 214:405-412.
239. Shi X, Garry DJ (2006) Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev* 20:1692-1708.

240. Silver FH, Horvath I, Foran DJ (2002) Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the $\alpha 1$ -chains found in types I-III collagen. *J Theor Biol* 216:243-254.
241. Smith CK, 2nd, Janney MJ, Allen RE (1994) Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* 159:379-385.
242. Spang JT, Tischer T, Salzmann GM, Winkler T, Burgkart R, Wexel G, Imhoff AB (2011) Platelet concentrate vs. saline in a rat patellar tendon healing model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:495-502.
243. Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J (1994) Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* 124:171-181.
244. Takala TE, Virtanen P (2000) Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports* 10:321-325.
245. Takamura M, Yasuda T, Nakano A, Shima H, Neo M (2017) The effect of platelet-rich plasma on Achilles tendon healing in a rabbit model. *Acta Orthop Traumatol Turc* 51:65-72.
246. Taylor MA, Norman TL, Clovis NB, Blaha JD (2002) The response of rabbit patellar tendons after autologous blood injection. *Med Sci Sports Exerc* 34:70-73.
247. Terada S, Ota S, Kobayashi M, Kobayashi T, Mifune Y, Takayama K, Witt M, Vadala G, Oyster N, Otsuka T, Fu FH, Huard J (2013) Use of an antifibrotic agent improves the effect of platelet-rich plasma on muscle healing after injury. *J Bone Joint Surg Am* 95:980-988.

248. Terry GC, Hughston JC (1985) Associated joint pathology in the anterior cruciate ligament-deficient knee with emphasis on a classification system and injuries to the meniscocapsular ligament-musculotendinous unit complex. *Orthop Clin North Am* 16:29-39.
249. Terry GC, LaPrade RF (1996) The biceps femoris muscle complex at the knee. Its anatomy and injury patterns associated with acute anterolateral-anteromedial rotatory instability. *Am J Sports Med* 24:2-8.
250. Tidball JG (1995) Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 27:1022-1032.
251. Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R345-353.
252. Toumi H, Best TM (2003) The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med* 37:284-286.
253. Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, Zhao C, An KN (2004) Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Ann Plast Surg* 53:393-397.
254. Vailas AC, Tipton CM, Laughlin HL, Tchong TK, Matthes RD (1978) Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 44:542-546.
255. Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H (2002) Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscul Disord* 12:584-587.
256. Valencic V, Knez N (1997) Measuring of skeletal muscles' dynamic properties. *Artif Organs* 21:240-242.

257. Virchenko O, Aspenberg P (2006) How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop* 77:806-812.
258. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, Katz A, Vainchenker W, Debili N (1998) Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* 91:3711-3723.
259. von Hundelshausen P, Weber C (2007) Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 100:27-40.
260. Wang JH (2006) Mechanobiology of tendon. *J Biomech* 39:1563-1582.
261. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, Simeonova PP (2002) Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J* 16:1630-1632.
262. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G (2005) Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:118-123.
263. Wetzel RJ, Patel RM, Terry MA (2013) Platelet-rich plasma as an effective treatment for proximal hamstring injuries. *Orthopedics* 36:e64-70.
264. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA (2003) The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost* 1:1897-1905.
265. White JG, Escolar G (1991) The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol* 56:233-242.
266. Williams JG (1986) Achilles tendon lesions in sport. *Sports Med* 3:114-135.

267. Xu K, Al-Ani MK, Sun Y, Xu W, Pan L, Song Y, Xu Z, Pan X, Yang L (2015) Platelet-rich plasma activates tendon-derived stem cells to promote regeneration of Achilles tendon rupture in rats. *J Tissue Eng Regen Med*.
268. Yanke AB, Bell R, Lee AS, Shewman E, Wang VM, Bach BR, Jr. (2013) Central-third bone-patellar tendon-bone allografts demonstrate superior biomechanical failure characteristics compared with hemi-patellar tendon grafts. *Am J Sports Med* 41:2521-2526.
269. Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Beauchamp JR, Partridge TA (2002) Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 281:39-49.
270. Zanon G, Combi F, Combi A, Perticarini L, Sammarchi L, Benazzo F (2016) Platelet-rich plasma in the treatment of acute hamstring injuries in professional football players. *Joints* 4:17-23.
271. Zehnder JL, Leung LL (1990) Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood* 76:2011-2016.
272. Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, Birk DE (2005) Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5:5-21.
273. Zhang J, Middleton KK, Fu FH, Im HJ, Wang JH (2013) HGF mediates the anti-inflammatory effects of PRP on injured tendons. *PLoS One* 8:e67303.
274. Zou J, Mo X, Shi Z, Li T, Xue J, Mei G, Li X (2016) A Prospective Study of Platelet-Rich Plasma as Biological Augmentation for Acute Achilles Tendon Rupture Repair. *Biomed Res Int* 2016:9364170.